



Mise en évidence d'immunomodulations médiées par les métabolites : de l'identification à l'application en contexte infectieux

Caroline Plazy

► To cite this version:

Caroline Plazy. Mise en évidence d'immunomodulations médiées par les métabolites : de l'identification à l'application en contexte infectieux. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALS015 . tel-03828518

HAL Id: tel-03828518

<https://theses.hal.science/tel-03828518>

Submitted on 25 Oct 2022

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.

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIS – Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Caroline PLAZY

Thèse dirigée par **Bertrand TOUSSAINT**
Et co-encadrée par **Dalil HANNANI**

préparée au sein du laboratoire **Translational Innovation in Medicine and Complexity**
Dans l'Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement

Mise en évidence d'immunomodulations médiées par les métabolites : de l'identification à l'application en contexte infectieux

Thèse soutenue publiquement le **3 Juin 2022**,
devant le jury composé de :

Monsieur Bertrand TOUSSAINT
PROFESSEUR DES UNIVERSITE - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Grenoble-Alpes, TIMC, Directeur de thèse

Monsieur Eric KIPNIS
PROFESSEUR DES UNIVERSITE - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Lille, Rapporteur

Madame Laetitia AYMERIC
MAITRE DE CONFERENCE,
Université de Nantes – TENS-INSERM, Rapporteuse

Monsieur Max MAURIN
PROFESSEUR DES UNIVERSITE - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Grenoble-Alpes, Président et Examineur

Monsieur François FENAILLE
DIRECTEUR DE RECHERCHE
CEA Paris Saclay, Examineur

Monsieur Dalil HANNANI
CHARGE DE RECHERCHE au CNRS
Université Grenoble-Alpes, TIMC, Co-encadrant de thèse, Invité

Madame Audrey LE GOUELLEC
MAITRE DE CONFERENCE -PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Grenoble-Alpes, TIMC, Invitée



Table des matières

Liste des figures.....	12
Liste des tableaux.....	17
Introduction.....	21
I. Réponses immunitaires impliquées au cours des infections respiratoires.....	21
1. Les mécanismes de défense du système respiratoire.....	21
2. L'immunité innée dans la réponse aux infections pulmonaires.....	22
➤ 2.1. Le système du complément	22
➤ 2.2. Les cellules de l'immunité innée	23
▪ 2.2.1. Les PNN.....	23
▪ 2.2.2. Les macrophages alvéolaires.....	24
▪ 2.2.3. Les Cellules Dendritiques.....	25
3. L'immunité adaptative dans la réponse aux infections pulmonaire, axe CD – LT :.....	27
➤ 3.1. Th1	27
➤ 3.2. Th2	27
➤ 3.3. Th17	28
➤ 3.4. Treg.....	28
➤ 3.5. Les cellules T _{FH} , les lymphocytes B et les plasmocytes	28
➤ 3.6. T CD8.....	29
II. Immunomodulations médiées par les métabolites et impact sur la polarisation T.....	30
1. Signal 2 – Molécules de co-stimulation et co-inhibition	31
2. Signal 3 – cytokines polarisantes.....	32
3. Un nouveau signal à prendre en compte, médié par les immunométabolites.....	32
III. Modèle d'étude des immunométabolites bactériens - infection chronique par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans la mucoviscidose.....	70
1. Modèle d'infection chronique pour l'évaluation de la modulation du système immunitaire induite par la bactérie	70
2. La mucoviscidose.....	71
➤ 2.1. Physiopathologie de la mucoviscidose	71
➤ 2.2. Epidémiologie de la mucoviscidose.....	72
➤ 2.3. Approche diagnostique de la maladie.....	72
➤ 2.4. Symptomatologie et prise en charge de la maladie	72
➤ 2.5. Suivi des fonctions respiratoires et exacerbations.....	73
3. Le pathogène majoritaire : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
➤ 3.1. Diagnostique microbiologique :	77

➤ 3.2. Prise en charge des infections à Pa chez les patients atteints de mucoviscidose.....	78
➤ 3.3. Description des facteurs de virulence, en regard du système immunitaire	79
▪ 3.3.1. Le lipopolysaccharide (LPS)	79
▪ 3.3.2. Facteurs de mobilité et d'adhésion aux cellules	79
▪ 3.3.3. Facteurs d'invasion.....	80
▪ 3.3.4. Sidérophores et pigments	83
▪ 3.3.5. Les molécules du Quorum sensing.....	83
▪ 3.3.6. La croissance en biofilm	84
➤ 3.4. Mécanismes d'adaptation chez l'hôte :	85
➤ 3.5. Immunité à l'encontre de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans la mucoviscidose.....	87
▪ 3.5.1. Implication des cellules épithéliales dans la genèse de l'inflammation pulmonaire.	87
▪ 3.5.2. Immunité innée	87
• 3.5.2.1. Système du complément.....	87
• 3.5.2.2. Implication des PNN	87
• 3.5.2.3. Place des macrophages pulmonaires.....	88
• 3.5.2.4. Implication des CD.....	89
▪ 3.5.3. Immunité adaptative	89
➤ 3.6. Métabolomes de Pa et étude par métabolomique.....	90
▪ 3.6.1. Métabolisme basal de Pa	91
▪ 3.6.2. La métabolomique, concept et techniques.....	93
▪ 3.6.3. Etudes métabolomique et Pa	96
Objectifs de la thèse	100
Work flow du projet de thèse	101
Chapitre I – Modèle d'étude de la modulation du système immunitaire par les bactéries en condition pathologique : infection chronique de patients atteints de mucoviscidose par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	103
I. Préambule	103
II. Cohorte des patients atteints de mucoviscidose	103
1. Critères de constitution de la cohorte de patients	103
2. Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude.....	104
III. Co-infections des patients de la cohorte.....	110
1. Matériel et Méthode	110
2. Résultats des co-infections et des colonisations des patients de l'étude	110
➤ 2.1. Co-infections identifiées chez les patients infectés chroniquement par Pa	110

➤ 2.2. Colonisations identifiées par Sa chez les patients de la cohorte	113
▪ 2.2.1. Définition des infections chroniques.....	113
▪ 2.2.2. Interactions bactériennes entre Pa et Sa	114
▪ 2.2.3. Résultats obtenus chez les patients de la cohorte	114
IV. Banque de souches cliniques de Pa.....	117
1. Constitution de la banque d'isolats cliniques de Pa.....	117
2. Caractérisation phénotypique des souches de la banque.	120
➤ 2.1. Matériel et Méthode	120
➤ 2.2. Résultats	121
▪ 2.2.1. Evaluation de la mucoïdie des isolats de la banque.....	121
▪ 2.2.2. Production de pigments	122
▪ 2.2.3. Cytotoxicité induite sur cellules dendritiques	124
➤ 2.3. Evaluation de la virulence globale des souches	124
▪ 2.3.1. Matériel et méthode	125
▪ 2.3.2. Résultats	126
▪ 2.3.3. Impact de la virulence sur l'évolution de l'état de santé respiratoire.	128
3. Mises au point de la culture des souches.....	130
➤ 3.1. Choix du milieu de culture des souches.	130
▪ 3.1.1. Présentation des milieux de culture à l'étude.....	130
▪ 3.1.2. Evaluation de différents milieux permettant la mise en évidence des différentes propriétés immunomodulatrices des souches cliniques.....	133
▪ 3.1.3. Evaluation des milieux permettant une caractérisation de l'exométabolome des souches par métabolomique.....	134
➤ 3.2. Impact de la phase de croissance sur l'évaluation de l'exométabolome.....	138
▪ 3.2.1. Matériel et Méthode	138
▪ 3.2.2. Résultats	139
4. Méthodologie optimisée de la culture des souches.	141
Chapitre II : Etude des capacités immunomodulatrices des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> médiée par les métabolites.....	144
I. Etude de la modulation de l'activation et la maturation de la CD par l'exométabolome des souches.....	145
1. Présentation générale du test immunologique <i>in vitro</i> et des mises au point.	145
➤ 1.1. Cellules d'étude : les DC2.4	145
➤ 1.2. Mise au point du test immunologique <i>in vitro</i> pour l'évaluation de SN complexes ou de métabolites purifiés.....	146

▪ 1.2.1. Matériel et Méthode	147
▪ 1.2.2. Sélection du milieu et du temps optimal de culture	147
➤ 1.3. Présentation des aspects techniques du test immunologique in vitro	149
➤ 1.4. Validation du test sur métabolites purifiés	151
▪ 1.4.1 Matériel et Méthode	151
▪ 1.4.2. Modulation de l'activation et la maturation des CD par les métabolites	151
➤ 1.5. Validation du test sur surnageants complexes.....	153
▪ 1.5.1. Matériel et Méthode	153
▪ 1.5.2. Evaluation de la sensibilité du test sur SN bactériens.....	154
2. Immunomodulations induites par les métabolites excrétés pendant les phases exponentielle et stationnaire de croissance sur la CD	155
➤ 2.1. Matériel et Méthode	155
➤ 2.2. Immunomodulations médiées par les métabolites pendant la phase de croissance exponentielle.....	156
➤ 2.3. Immunomodulations induites par les métabolites excrétés par les souches sur la CD pendant la phase stationnaire de croissance.....	160
➤ 2.4. Discussion : rôle du PD-L2 dans la régulation de l'immunité	163
3. Evolution des propriétés immunomodulatrices des souches au cours de la croissance bactérienne.	166
4. Etude d'une évolution vers un phénotype immunologique commun au cours du temps.	167
II. Evaluation de l'impact des métabolites excrétés sur la polarisation des LT	168
1. Matériel et Méthode	168
2. Impact de l'exométabolome des souches sur la polarisation des LT	170
III. Impact des capacités immunomodulatrices des souches sur la fonction respiratoire des patients infectés chroniquement par Pa.....	173
IV. Immunomodulations induites par les souches et infection chroniques par Sa	175
V. Validation des propriétés immunomodulatrices des souches in vivo.....	176
1. Matériel et Méthode	176
2. Immunité développée <i>in vivo</i> , contre les souches aux propriétés immunomodulatrices distinctes.	178
➤ 2.1. Infiltration et maturation des monocytes et des PNN intrapulmonaire en présence des souches aux propriétés immunomodulatrices distinctes.....	178
➤ 2.2. Evaluation de la modulation de l'activation et de la maturation des CD	178
3. Evaluation de la polarisation des LT au cours du challenge infectieux	180
Chapitre III : Caractérisation de l'exométabolome des souches par métabolomique.....	186
I. Technique des analyses de métabolomique par LC-MS/MS.....	188

1.	Acquisition sur colonne C18	188
2.	Acquisition sur colonne HILIC.....	189
3.	Standards internes	191
4.	Traitement des données ou pré-processing	192
➤	4.1. Pré-processing par le logiciel logiciel MZmine	192
➤	4.2. Pré-processing par R.....	196
➤	4.3. Validation de l'expérimentation et contrôles qualité des données obtenues.....	197
➤	4.4. Présentation des données obtenues par acquisition sur colonnes HILIC	199
II.	Caractérisation du SCFM	199
1.	Acquisition de l'ensemble des constituants.....	199
2.	Consommation et production de métabolites d'intérêts :	201
III.	Identification des features d'intérêts.....	201
IV.	Analyses statistiques des données générées par métabolomique et intégration biologique 203	
1.	Normalisation	203
2.	Analyses non supervisées de l'exométabolome des souches.....	204
3.	Analyses supervisées de l'exométabolome des souches	205
➤	3.1. Comparaison de l'exométabolome entre les phases de croissance	206
➤	3.2. Comparaison de l'exométabolome des souches Précoces et Tardives.....	209
➤	3.3. Comparaison de l'exométabolome en fonction de la virulence des souches.....	210
Chapitre IV : Impact de l'exométabolome dans la régulation de l'immunité : mise en évidence d'immunométabolites bactériens.		214
I.	Corrélation des résultats obtenus lors des caractérisations immunologiques et métabolomiques pour l'identification de potentiels immunométabolites.....	214
1.	Approches non supervisées pour l'évaluation du lien entre l'exométabolome et les propriétés immunomodulatrices des souches.....	214
2.	Implication du métabolisme et de l'endométabolome dans les immunomodulations observées	217
3.	Corrélation exométabolome et transcriptome	217
4.	Approches supervisées pour l'identification des métabolites immunomodulateurs	219
➤	4.1. Identification de métabolites immunostimulants ou immunosuppresseurs.....	219
➤	4.2. Métabolites immunosuppresseurs.....	224
➤	4.3. Métabolites immunostimulants	224
➤	4.4. Identification de métabolites modulant l'expression du PD-L2	225
➤	4.5. Bilan et interprétation	226

▪ 4.5.1. Métabolites immunosuppresseurs, mise en contexte scientifique	226
▪ 4.5.2. Métabolites immunostimulants, mise en contexte scientifique :.....	227
▪ 4.5.3. Métabolites induisant une surexpression du PD-L2, mise en contexte scientifique	229
II. Validation des propriétés immunomodulatrices des métabolites candidats identifiés	229
1. Evaluation des métabolites candidats purifiés sur CD	229
2. Evaluation des métabolites candidats sur Co-culture DC – lymphocytes	231
III. Investigation de différentes approches pour contrebalancer l'immunité induite par les souches, <i>in vivo</i> – Traitement post biotique	232
1. Modèle utilisé pour l'étude de la compensation de la modulation immunitaire induite par les isolats cliniques.	232
2. Polarisation des LT induite <i>in vivo</i> , par les souches « compensées »	233
Discussion	238
Conclusion	242
Références.....	244
Liste des communications affichées et orales.....	269
Abstract	271
Résumé	272

Liste des figures

Figure 1 - Représentation des différents éléments intervenant dans la phagocytose générée par les PNN	24
Figure 2- Macrophages de type M1 ou M2 et ses différents sous types, ainsi que leur implication au cours de l'inflammation et de la réparation	25
Figure 3 - Représentation des différents TLR présents au niveau de la membrane plasmique ou des vésicules d'endocytose	26
Figure 4 - Synthèse des 3 signaux orientant la polarisation des LT après stimulation par un pathogène	30
Figure 5 - Présentation de l'ensemble des molécules de co-activation et de co-inhibition impliquées dans la modulation de l'activation et de la polarisation des LT par les CD	31
Figure 6 - Synthèse des différentes cytokines produites par les CD à l'origine de la polarisation du LT, et présentation des cytokines produites par les différents sous types de LT.	32
Figure 7 - Présentation des volumes pulmonaires par spirométrie et pléthysmographie	74
Figure 8 - Représentation de l'évolution du VEMS en fonction de l'âge des patients, en 1992, 2003 et 2014.	75
Figure 9 - Evolution du type de germes infectant les patients atteints de mucoviscidose en fonction de leur âge	76
Figure 10 - Récapitulatif des facteurs de virulence de Pa	84
Figure 11 - Résumé des adaptations de Pa au cours des infections chroniques de patients atteints de mucoviscidose	86
Figure 12 - Présentation des grandes voies impliquées dans le métabolisme énergétique centrale de Pa	92
Figure 13 - Présentation des analyses de métabolomique en LC-MS/MS	94
Figure 14 - Variation de la valeur du VEMS exprimé en pourcentage de la valeur théorique entre le moment du recueil des isolats précoces et tardifs pour l'ensemble des patients de la cohorte .	105
Figure 15 – Impact de la durée de l'infection et de l'âge des patients sur l'évolution de la fonction respiratoire.....	106
Figure 16 – Evaluation des fonctions respiratoires des patients de la cohorte au cours du suivi de l'étude.....	108
Figure 17 – Représentation en violine plot de la valeur du VEMS lors du prélèvement des isolats précoces et tardifs en fonction des différents paramètres permettant d'évaluer la fonction respiratoire des patients	108
Figure 18 - Proportion de co-infections à Sa (A) ou à Ca (B) identifiées en fonction de l'âge des patients.	112
Figure 19 - Co-infections identifiées au cours du suivi de l'étude par Ca et Sa.....	113
Figure 20 –Proportion de co-infections à Sa et existence d'une colonisation chronique chez les patients en fonction des réponses cliniques observées.	115
Figure 21 – Collecte de différents isolats pour chaque patient inclus dans l'étude, et sélection des isolats Précoces et Tardifs pour la constitution de la banque.	117
Figure 22 - Validation de la clonalité des isolats	119

Figure 23 – Evaluation de la mucoïdie des isolats de la banque et évolution du statut mucoïde au cours du temps.....	122
Figure 24 - Evaluation de la production de pigments par les souches cliniques de la banque.....	123
Figure 25 - Représentation de la répartition des souches en ACP sur les différentes composantes, en fonction de l'expression de facteurs de virulence	126
Figure 26 - Représentation des différents degrés de corrélation dans l'expression des facteurs de virulence par les souches de Pa.	127
Figure 27 - Représentation de la clusterisation des souches en fonction des mécanismes de virulence mis en place, par approche de CAH et dendrogramme par l'algorithme des Kmeans..	128
Figure 31 - Etude de l'impact du milieu de culture sur l'activation et la maturation de la CD induite par les molécules excrétées dans les SN de culture par les souches, grâce au test immunologique in vitro..	134
Figure 28 - Représentation de la séparation des SN des souches des 3 patients lors de la culture en milieu M9 par analyse ACP, et dendrogramme constitué par CAH.	136
Figure 29 - Représentation de la séparation des SN des souches des patients lors de la culture en milieu SCFM et de la classification des souches des 3 patients.....	137
Figure 30 - Représentation des pools des SN des souches Précoces (Early) et Tardives (Late) cultivées en milieu M9 et SCFM, ainsi que les milieux seuls sans croissance bactérienne (analyse non supervisée de type ACP). Les échantillons ont été évalués en triplicat.	138
Figure 32 – Expression de la MFI du CMHII et du CD40 induite par le LPS modulée par les SN collectés à différentes phase de la courbe de croissance de culture.	140
Figure 33 - Présentation des étapes nécessaires à la culture des isolats de la banque.....	142
Figure 34 - Représentation schématique de la mise au point du test immunologique in vitro, ainsi que la méthode d'évaluation de l'ensemble des exométabolomes des souches cliniques.	145
Figure 35 – Lignée de CD, les DC2.4 en culture	146
Figure 36 – Comparaison de l'activation et de la maturation de la CD en milieu de culture RPMI et AIMV	148
Figure 37 – Etude de l'évolution de la survie cellulaire des DC2.4 ainsi que de l'expression des marqueurs membranaires en fonction du temps de culture.	148
Figure 38 - Work Flow des analyses de l'activation et de la maturation des CD par CMF.	150
Figure 39 – Représentation en histogramme de l'expression de différents marqueurs membranaires à l'état basale puis sous activation LPS et en présence de Kynurénine purifiée ...	152
Figure 40 - Evaluation de l'effet de la Kynurénine sur l'expression des différents marqueurs membranaires	152
Figure 41 - Effet de l'arginine sur l'expression des différents marqueurs membranaires.	153
Figure 42 - Voie métabolique et enzymes impliquées dans la métabolisation du tryptophane.....	154
Figure 43 - Validation de la construction CHAΔKynU par LC-MS/MS et caractérisation immunologique.....	155
Figure 44 - Représentation en ACP des souches en fonction de l'expression des marqueurs membranaires de la CD sous activation LPS modulées par la présence des SN des souches collectés en phase exponentielle de croissance	156
Figure 45 – Organisation des variables dans la séparation des souches dans l'ACP et observation de la corrélation inter-variables.....	157
Figure 46 - Représentation de la clusterisation des souches en phase de croissance exponentielle.	158

Figure 47 - Expression des marqueurs membranaires des CD en fonction des clusters immature et immunostimulants.	159
Figure 48 – L’ensemble des individus n’ont pas un poids significatif dans les représentations de type ACP.	159
Figure 49 - Représentation de la clusterisation des souches en phase de croissance stationnaire.	161
Figure 50 – Validation des Clusterisations obtenues par un deuxième algorithme.	161
Figure 51 - Expression des marqueurs membranaires à la surface des CD modulée par les SN des souches appartenant aux différents clusters identifiés en ACP.	162
Figure 52 - Evolution des capacités immunomodulatrices entre les phases de croissance exponentielle et stationnaire.	166
Figure 53 - Représentation des isolats Précoces (Early) et Tardifs (Late) en fonction de l’expression des différents marqueurs à la surface de la CD, en ACP.	167
Figure 54 - Aspect des CD et des LT au cours de la co-culture en présence des SN de culture des souches	170
Figure 55 - Expression des marqueurs membranaires des BMDC sous activation LPS en présence de métabolites purifiés ou de l’exométabolome des souches.	171
Figure 56 - Polarisation des LT obtenue in vitro, après contact avec les BMDC matures et activées en présence de la Kynurénine ou des SN des souches aux propriétés immunomodulatrices distinctes.	172
Figure 57 - Evaluation de l’impact des propriétés immunomodulatrices des souches sur la fonction respiratoire des patients	174
Figure 58 - Représentation du challenge infectieux réalisé avec les souches aux différentes propriétés immunomodulatrices : immunostimulantes PD-L2 ^{high} et PD-L2 ^{Low} et immunosuppressive	176
Figure 59 - Valeur de MFI en phase exponentielle des différents marqueurs membranaires obtenue par le test immunologique in vitro, en fonction de leur appartenance aux clusters immunologiques.	178
Figure 60 - Infiltration pulmonaire en monocytes et PNN en fonction des 3 types de souches utilisées pour le challenge infectieux.	178
Figure 61 - Activation et maturation des CD en fonction des 3 types de souches	179
Figure 62 - Polarisation des LT induite au cours du challenge infectieux en fonction des souches aux propriétés immunomodulatrices différentes.	181
Figure 63 - Polarisation des LT obtenue lors de la duplication du challenge infectieux avec les souches immunostimulante PD-L2 ^{high} et immunosuppressive, par rapport au groupe contrôle et présentation des résultats obtenus pour le sous type Th17	181
Figure 64 - Work flow des analyses par métabolomique non ciblée en LC-MS/MS.....	186
Figure 65 - Représentation des différents types d’analyses statistiques multivariées appliquées notamment aux analyses de métabolomique.	187
Figure 66 - Représentation des chromatogrammes obtenus après analyse sur colonne de chromatographie HILIC, avant et après optimisation de la méthode d’acquisition, permettant d’obtenir une meilleure séparation des pics du chromatogramme.	190
Figure 67 – Chromatogrammes obtenus lors de l’analyse des standards internes en purifiés et dans un échantillon complexe.....	191
Figure 68 - Chromatogramme obtenu lors de l’analyse des composants du milieu de culture SCFM seul.....	193
Figure 69 - Exemple de chromatogramme de l’exométabolome des souches cliniques	193

Figure 70 – Evaluation des résultats de l’optimisation de la déconvolution.....	194
Figure 71 – Optimisation de la sélection des pics de chromatographie	194
Figure 72 – Evaluation de l’impact de l’algorithme « Gap filling » sur les valeurs d’intensité des SI	196
Figure 73 - Représentation de l’intensité ionique totale de chaque échantillon au cours de l’acquisition.....	197
Figure 74- Représentation des intensités ioniques totales par groupe et par patient.....	198
Figure 75 - Chromatogramme représentant les pics obtenus pour chacun des constituants du SCFM une fois superposés et annotés.....	200
Figure 76 - Comparaison des intensités ioniques totales des différentes phases de croissance par rapport au milieu de culture.....	201
Figure 77 - Représentation d’un des réseaux générés par Cytoscape sur les données de métabolomique	202
Figure 78 – Résultats de la normalisation réalisée pour les features et les échantillons	204
Figure 79 - Clusterisation de l’exométabolome des souches cliniques en phase exponentielle de croissance par analyse ACP, non supervisée.....	204
Figure 80 - Clusterisation de l’exométabolome des souches cliniques en phase de croissance stationnaire (ACP).....	205
Figure 81 - Représentation ACP de l’exométabolome des souches en phase de croissance exponentielle et en phase stationnaire	206
Figure 82 – Analyse supervisée des exométabolomes en fonction de la phase de croissance	206
Figure 83 - Dendrogramme présentant la séparation des exométabolomes en fonction de la phase de croissance	207
Figure 84 - Heatmap généré par t-test ou PLS-DA sur les features significatifs	208
Figure 85 - Clusterisation des exométabolomes par la méthode SOM et la méthode des Kmeans	208
Figure 86 - Analyses supervisées de l’exométabolome des souches Précoces (Early) et Tardives (Late)	209
Figure 87 – Métabolites candidats impliqués dans la cytotoxicité des exométabolomes des souches	210
Figure 88 - Représentation de la voie métabolique du cyanure d’hydrogène chez Pa.....	211
Figure 89 – Analyses non supervisées des exométabolomes des souches en fonction des propriétés immunomodulatrices.....	215
Figure 90 - : Clusterisation des exométabolomes des souches et comparaison avec les caractéristiques immunologiques.	215
Figure 91 - Répartition des souches aux propriétés immunomodulatrices différentes en fonction des clusters métaboliques	216
Figure 92 - Représentation de la courbe ROC de l’empreinte métabolique des souches en fonction de leurs propriétés immunomodulatrices	216
Figure 93 - Clusterisation HCPC des isolats de la banque sur les données d’endométabolome...217	
Figure 94 - Représentation ACP des données de transcriptomique et appartenance aux immunotypes	218
Figure 95 - CAH des souches obtenues sur les données de transcriptomique	218
Figure 96 - Classification des souches selon leur appartenance aux clusters définis par transcriptomique, sur les propriétés immunologiques et par métabolomique	219

Figure 97 – Les métabolites dont les concentrations diffèrent significativement entre les groupes sont identifiés par une analyse supervisée de type PLS-DA	219
Figure 98 - Identification des features discriminants les deux types de souches immunostimulantes ou immunosuppressives	220
Figure 99 - Heatmap permettant de confirmer les métabolites d'intérêt préalablement identifiés par PLS-DA et t-test	220
Figure 100 - Représentation des métabolites et enzymes surexprimés par les souches appartenant aux différents immunoclusters identifiés par analyses supervisées	223
Figure 101 - Analyse par PLS-DA de l'exométabolome des souches, permettant de mettre en évidence une différence marquée entre les groupes induisant une expression variable du PD-L2	225
Figure 102 - Volcanoplot des métabolites pouvant moduler l'expression du PDL2 à la surface des CD.	225
Figure 103 - Investigation des métabolites immunomodulateurs par le test immunologique in vitro	230
Figure 104 - Représentation des différentes populations de LT CD4+ obtenues par co-culture allogénique de CD-LT induites par les métabolites investigués pour leur propriétés immunomodulatrices	231
Figure 105 - Schéma du challenge infectieux conduit in vivo permettant d'évaluer la capacité d'un métabolite purifié ou d'un SN bactérien, à « compenser » l'immunité induite par la bactérie	233
Figure 106 - Représentation des différentes polarisations induites par les souches, ou par les souches «compensées», ou par l'exométabolome de la souche immunostimulante seul. La compensation des souches modifie bien le profil de LT obtenue	234
Figure 107 - Proportion de Th17 infiltrants le poumon lors de l'infection par les souches, ou par les souches « compensées », ou par l'exométabolome de la souche immunostimulante seul	234
Figure 108 - Représentation des résultats de l'étude concernant l'identification des propriétés immunomodulatrices des souches de Pa infectant chroniquement les patients et caractérisation des métabolites et des voies métaboliques impliquées	236

Liste des tableaux

Tableau I : Différentes types d'infections dues à Pa.....	76
Tableau II : Synthèse des études de métabolomique conduites sur Pa et les patients atteints de CF...	96
Tableau III : Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude.....	105
Tableau IV : Description des germes responsables de co-infections, proportion du germe sur l'ensemble des prélèvements des patients de la cohorte.....	111
Tableau V : Composition du milieu de culture PIA.....	120
Tableau VI : Récapitulatif des caractéristiques phénotypiques des souches de la banque.....	124
Tableau VII : Composition du milieu LB.....	131
Tableau VIII : Composition du milieu M9 optimisé pour la culture de <i>P. aeruginosa</i>	131
Tableau IX : Composition du milieu de culture SCFM.....	132
Tableau X : Panel d'anticorps utilisé en CMF pour caractériser la polarisation des LT induite par les SN des souches ayant des propriétés immunomodulatrices différentes.....	169
Tableau XI : Résultats obtenus lors de test compétition entre les souches de Pa et Sa.....	175
Tableau XII : Panel d'anticorps utilisé en CMF pour l'analyses des cellules immunitaires impliquées dans la réponse à l'infection contre Pa.....	177
Tableau XIII : Comparaison de différentes techniques d'analyse sur colonne C18.....	189
Tableau XIV : Comparaison de différentes méthodes d'analyse sur colonne HILIC.....	190
Tableau XV : Caractérisation des constituants du milieu de culture SCFM sur colonne C18 et notre méthode.....	200
Tableau XVI : Scores R2 et Q2 pour chaque composante du modèle PLS-DA.....	207
Tableau XVII – Liste des métabolites identifiés et valeur statistique.....	222

Liste des abréviations

ABC : ATP Binding Cassette
ACP : Analyse en Composante Principale
ADN : Acide Desoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
AhR : Aryl Hydrocarbon Receptor
BGN : Bacille Gram Négatif
BMDC : Bone Marrow derived Dendritic Cell
Ca : *Candidas albicans*
CAH : Classification Ascendante Hiérarchique
CD : Cellule Dendritique ou Cluster de différenciation si associé à un chiffre
CDp : CD plasmacytoïdes
CF : Cystic Fibrosis
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CFU : Colony Forming Unit
CMF : Cytométrie en Flux
CMH : Complexe Majeur d'histocompatibilité
CNIL : Commission Nationale Informatique et Liberté
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CRCM : Centre des Ressources et des Compétences sur la Mucoviscidose.
CVF : Capacité Vitale Fonctionnelle
DHQ : quinoline 2,4-quinolinediol
DO : Densité Optique
DRCI : Délégation à la recherche clinique et à l'innovation
ECBC : Examen cyto-bactériologique des crachats
EFR : Evaluation de la fonction respiratoire
FBMN : Feature Base Molecular Networking
FA : Acide Formique
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting
FoxP3 : Forkhead box P3
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GN : Gram Négative
GP : Gram Positive
HAQ : 4-hydroxy-2-alkylquinoline
HIF : Hypoxia-Inducible Factor-1
HOCl : acide hypochloreux
I3A : Indole-3-aldéhyde
IAA : Indole-3-acetic-acid
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobulines
IL : Interleukine
iNOS : Oxyde nitrique synthase
LBA : lavage broncho-alvéolaire
LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LPS : Lipopolysaccharide
 LB : Lymphocyte B
 LT : Lymphocyte T
 LT_{FH} : Lymphocyte T Follicular Helper
 Mbp : Million de paires de bases
 MPO : Myélopéroxydase
 NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 NETose : Neutrophil Extracellular Traps
 NFκB : Nuclear Factor-Kappa B
 NLR : NOD-like receptor
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 OprF : Outer membrane Porin G
 Pa : *Pseudomonas aeruginosa*
 PAF : Facteur d'activation plaquettaire
 PAMDB : Pseudomonas Aeruginosa Metabolome Database
 PAMPs : Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes
 PD-L1 : Programmed Death-Ligand (PD-L)1
 PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis
 PIA : Pseudomonas Isolation Agar
 sPLA2 : phospholipase sécrétoire A2
 PNN : Polynucléaire neutrophiles
 PolyIC : Acide Polyinosinique-polycytidilique
 PNDs : Programme National de Soins
 PRR : Pattern recognition receptor
 QS : Quorum sensing
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
 RORγ : RAR-Related Orphan receptor gamme
 ROS : espèces réactives de l'oxygène
 Sa : *Staphylococcus aureus*
 SCFM : Synthetic Cystic Fibrosis Medium
 SCV : Small Colonies Variant
 SN : surnageant
 SST : système de sécrétion de type
 STAT : Signal transducer and activator of transcription
 SVF : Sérum de Veau Fœtal
 TCA : cycle de l'acide tricarboxylique
 TCR : récepteur des cellules T
 TGFβ : Transforming Growth Factor B
 TFs : Facteurs tissulaires inflammatoires
 Th : T Helper
 TNF : Facteur de nécrose tumorale
 TLR : Toll Like Receptor et TLRL : Ligand de Toll Like Receptor
 TVO : troubles ventilatoires obstructif
 VEMS : Volume expiratoire maximale seconde
 VRE : Volume de réserve expiratoire et VRI : Volume de réserve inspiratoire

Introduction

I. Réponses immunitaires impliquées au cours des infections respiratoires

1. Les mécanismes de défense du système respiratoire.

Le premier mécanisme de défense dont nous disposons pour faire face aux agents pathogènes est la barrière épithéliale et dans le contexte pulmonaire, l'épithélium respiratoire. Il constitue une barrière mécanique et se constitue de cellules particulières comme les cellules caliciformes, les cellules ciliées ou les pneumocytes de type II. Les cellules caliciformes produisent le mucus, constitué de glycoprotéines appelées mucines, qui recouvrent les voies respiratoires. Il protège de la pénétration des pathogènes en limitant leur adhésion. Les cellules ciliées permettent d'éliminer le mucus qui aura impacté les micro-organismes externes. Enfin les cellules épithéliales ont la capacité de produire des cytokines, chimiokines et peptides antimicrobiens qui en plus d'éliminer les pathogènes, jouent un rôle dans la régulation de l'inflammation¹.

Des mécanismes de protection chimiques sont également mis en jeu dans la lutte contre les infections. On retrouve en premier lieu le surfactant produit par les pneumocytes de type II. En plus de ses propriétés tensioactives permettant aux alvéoles de ne pas se collaber, il contient deux collectines pulmonaires nommées SP-A et SP-D, capables de se lier aux pathogènes. Elles favorisent le chimiotactisme des Polynucléaires Neutrophiles (PNN) et des macrophages, ainsi que la reconnaissance et l'élimination des pathogènes par un mécanisme d'opsonisation par fixation à leurs récepteurs présents à la surface membranaire des pneumocytes de type II ou des macrophages². D'autres protéines antimicrobiennes, produites par les cellules épithéliales ou les macrophages, agissent au niveau des muqueuses. On retrouve des enzymes bactériennes telles que le lysozyme ou la phospholipase sécrétoire A2 (sPLA2). Le lysozyme a la capacité de cliver des constituants du peptidoglycane, cette enzyme est donc plus active vis-à-vis des bactéries Gram positives (GP) que vis-à-vis des bactéries Gram négatives (GN) dont le peptidoglycane est moins accessible puisque recouvert de Lipopolysaccharide (LPS)³. La sPLA2 qui agit sur les bactéries par hydrolyse des phospholipides membranaires, présente également un effet bactéricide plus marqué sur les bactéries GP^{4,5}. En l'occurrence au niveau pulmonaire, ce sont des infections à bactéries GP qui sont le plus souvent mises en évidence⁶. D'autres protéines ont été impliquées, ce sont les peptides antimicrobiens. Trois classes de peptides antimicrobiens sont décrites : les défensines, les cathélicidines ou les histatines. Les défensines α et β , produites respectivement par les PNN et les cellules épithéliales ou les pneumocytes de type II, ont une action directe vis-à-vis des bactéries, mais également par recrutement de cellules immunitaires innées et adaptatives⁷. Un des mécanismes d'action directe est possible par leur structure de peptides cationiques capables de pénétrer dans la

membrane des bactéries grâce à l'attraction électrostatique. Une fois enchâssées dans la membrane, elles sont capables de créer des pores responsables de la lyse des bactéries⁸. Les cathélicidines ont le même mécanisme d'action que les défensines et différents de celles-ci de par leur structure⁷.

Enfin un mécanisme de défense vis-à-vis des pathogènes est le microbiote pulmonaire. Le microbiote comprend tous les micro-organismes qui vivent dans un environnement défini, en l'occurrence ici, l'Homme. Il est constitué de trillions d'organismes qui évoluent en symbiose avec notre organisme⁹. Le microbiote, et notamment le microbiote intestinal, est fortement impliqué en santé humaine^{10,11}. Son importance a notamment été mise en évidence dans le développement et l'équilibre du système immunitaire^{12,13}. Différents microbiotes ont été décrits, intestinal, cutané, oro-pharyngé, vaginal et plus récemment, le microbiote pulmonaire. Le microbiote pulmonaire joue un rôle dans la lutte contre les infections par un mécanisme de compétition, les bactéries commensales constituant une véritable barrière bloquant l'adhésion de bactéries pathogènes. Elles permettent également de préserver l'intégrité de la muqueuse pulmonaire¹⁴.

2. L'immunité innée dans la réponse aux infections pulmonaires

Lorsque les mécanismes présentés auparavant se montrent insuffisants pour lutter contre les infections, les pathogènes vont pénétrer dans l'organisme et vont faire face à deux mécanismes d'élimination non spécifiques : le système du complément et surtout la mise en jeu des cellules de l'immunité innée.

➤ 2.1. Le système du complément

Le système du complément élimine les pathogènes directement ou en favorisant leur clairance par un mécanisme d'opsonisation comme on le rencontre avec les anticorps. C'est au niveau de l'arbre respiratoire que ce système de défense est le plus actif¹⁵. Il est constitué d'une trentaine de protéines plasmatiques qui ne sont activées qu'en conditions pathologiques. Si celles-ci sont fortement synthétisées au niveau hépatique, elles peuvent également être produites par les pneumocytes de type II, les cellules épithéliales pulmonaires et les macrophages alvéolaires. Cette production est accrue en présence de cytokines ou en conditions inflammatoires¹⁶. Trois voies d'activation du complément ont été décrites : la voie des lectines, la voie classique et la voie alternative. Dans la lutte contre les bactéries infectant les voies respiratoires, ce sont les 2 premières voies qui sont majoritairement mises en jeu par leur capacité de reconnaissance notamment de l'acide téichoïque chez les bactéries GP et du LPS chez les bactéries GN¹⁶. Ces 3 voies ont la même finalité, la génération d'une C3 convertase qui va cliver la protéine C3 en deux fragments : C3a et C3b. C3a permet le recrutement de cellules phagocytaires sur le site de l'infection, tandis que C3b reste fixé au pathogène permettant son opsonisation et son élimination par phagocytose. Enfin, ces cascades d'activation permettent de générer, par l'intermédiaire de C5, un complexe d'attaque

membranaire capable d'éliminer directement le pathogène en créant un pore dans la membrane de la bactérie. Le complément constitue un intermédiaire important entre le système immunitaire inné et adaptatif¹⁶.

➤ 2.2. *Les cellules de l'immunité innée*

Il a été décrit, en conditions physiologiques, que les cellules sentinelles pulmonaires étaient les macrophages alvéolaires, représentant 95% des cellules immunitaires. La deuxième population est constituée des lymphocytes (1 à 4%) quand les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont minoritaires, à environ 1%¹⁷.

▪ 2.2.1. Les PNN

Si les PNN sont peu présents dans les poumons sains à l'état basal, ils sont recrutés rapidement lors de la pénétration d'un agent pathogène au niveau du site de l'infection par chimiotactisme¹⁸. Leur activité principale est la phagocytose (Figure 1). Les grandes étapes de ce mécanisme majeur dans l'élimination des bactéries débutent par l'adhérence à la bactérie que ce soit après opsonisation par des anticorps, reconnus par le récepteur Fc, ou des protéines du complément ; reconnues par les récepteur CR, mais également par interaction directe avec des Toll-Like Receptor (TLR), récepteurs que nous reverrons plus en détails dans la partie concernant les cellules dendritiques (CD). Le PNN crée ensuite une vacuole dénommée phagosome permettant d'internaliser la bactérie. Vacuole qui fusionnera ensuite avec le lysosome pour former le phagolysosome. Les PNN contiennent également 2 types de granules qui sont générés durant la différenciation de la cellule et qui pourront fusionner avec le phagolysosome pour permettre l'élimination du pathogène. Les granules primaires contiennent le lysozyme, la myéloperoxydase (MPO), l'élastase et la Défensine. Les granules secondaires contiennent en plus du lysozyme, la lactoferrine. Les granules tertiaires et les vésicules sécrétoires contiennent des éléments qui permettent aux PNN d'interagir avec leur environnement, afin de dégrader ou d'adhérer à la matrice extracellulaire. La NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase et la MPO participent au métabolisme oxydatif permettant de générer les espèces réactives de l'oxygène (ROS), un puissant mécanisme impliqué dans la clairance bactérienne. La NAPDH oxydase va générer des anions superoxydes qui seront convertis en peroxyde d'hydrogène, pouvant être transformé par la MPO en HOCl (acide hypochloreux) en présence d'ion chlore. En parallèle, la lactoferrine permet de créer un mécanisme de compétition pour le fer avec les bactéries possédant des sidérophores. Après avoir digéré la bactérie, le PNN rentre en apoptose permettant également la régulation de l'inflammation.

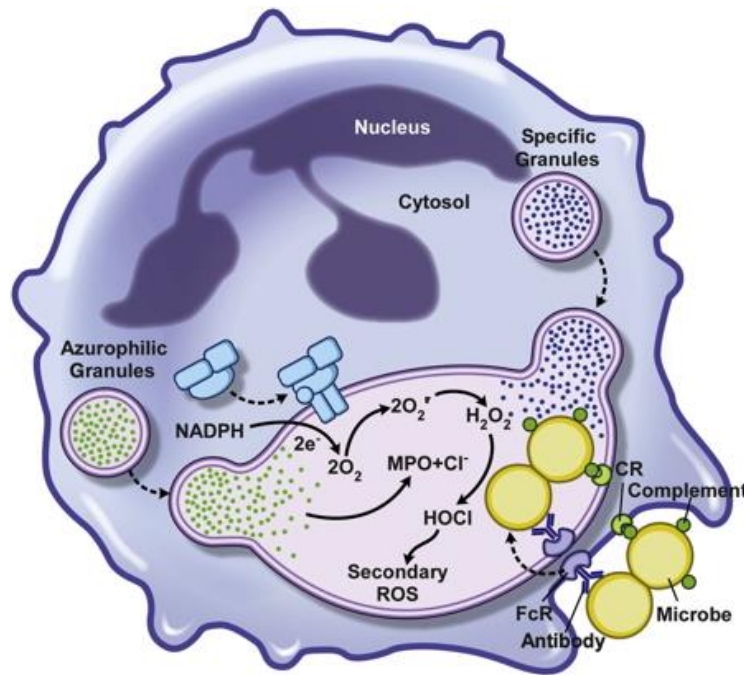


Figure 1 - Représentation des différents éléments intervenant dans la phagocytose générée par les PNN

En plus de l'activité de phagocytose le PNN est capable d'induire la NETose (Neutrophil Extracellular Traps), c'est un mécanisme par lequel l'ADN habituellement dégradé au cours de l'apoptose est relargué dans le milieu extracellulaire générant alors un ensemble de fibres servant à piéger les bactéries et à empêcher leur dissémination.

■ 2.2.2. Les macrophages alvéolaires

Le macrophage alvéolaire joue un rôle essentiel dans la reconnaissance et l'élimination des pathogènes¹⁸. Ils agissent en phagocytant les pathogènes lors de la pénétration dans l'organisme mais également en servant de cellule présentatrice d'antigène (CPA). Deux types de macrophages sont décrits (Figure 2). Les macrophages pro-inflammatoires ou M1, caractérisés par la production de cytokines pro-inflammatoires tels que l'Interleukine (IL)-12, l'IL-1 β , l'IL-6 mais également l'expression de iNOS (Oxyde nitrique synthase). Ils sont induits par la reconnaissance du LPS, constituant de la membrane externe des bactéries ou des pathogènes par les NLR (NOD-like receptor) qui induisent la formation de l'inflammasome. A l'inverse les macrophages M2 dits anti-inflammatoires ou tolérogènes sont caractérisés par une forte production d'IL-10 et l'expression de l'arginase 1. Il existe en réalité différents types de macrophages M2 (Figure 2)¹⁹. Les macrophages M2a sont aussi appelés « pro-fibrotiques » et sont pro-T helper (Th) 2 (les spécificités des sous types de LT seront présentées dans la partie immunité adaptative). Les macrophages M2b sont dits « immunorégulateurs » et entraînent également une polarisation des T naïfs vers une polarisation Th2. Enfin les M2c sont dits « immunosuppresseurs » car ils entraînent cette fois-ci une production de LT régulateurs.

Ce sont les macrophages de type M1 qui sont impliqués dans la réponse antimicrobienne. Ils sont les premiers mis en jeu dans les infections aiguës, puis ce sont les macrophages de type M2 qui prennent le relais pour diminuer l'inflammation et aider à la réparation tissulaire.

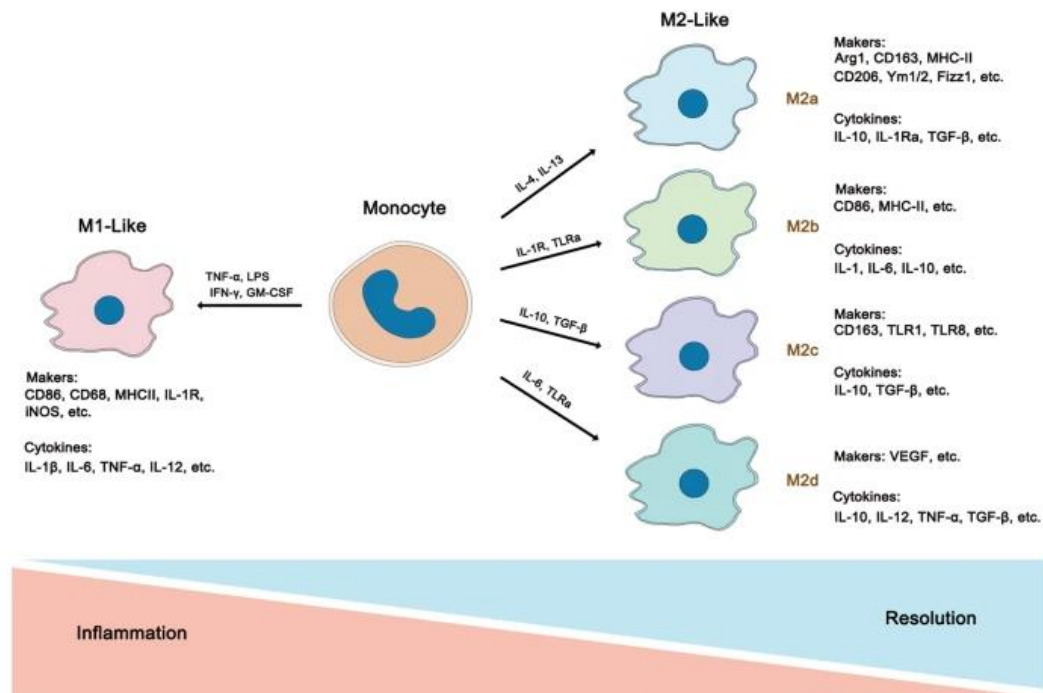


Figure 2- Macrophages de type M1 ou M2 et ses différents sous types, ainsi que leur implication au cours de l'inflammation et de la réparation (issue de Wang Y. et al., Cell Death and Disease, 2020)

Un des mécanismes d'élimination des bactéries mis en place par les macrophages sous activation LPS est l'axe succinate-HIF1 α -IL-1 β . La stimulation du TLR4 par le LPS entraîne une reprogrammation métabolique du macrophage responsable de l'accumulation du succinate transformé par la suite en ROS. Cette reprogrammation entraîne également l'induction du facteur de transcription HIF1 α responsable de la production d'IL1 β . Cette cytokine est essentielle à la clairance bactérienne notamment par le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité adaptative. La production de ROS par les macrophages peut entraîner une cytotoxicité vis-à-vis des cellules pulmonaires et des dommages pulmonaires. Pour réguler cette voie métabolique, la mitochondrie va également produire du citrate métabolisé ensuite en Itaconate. Ce métabolite exerce une boucle de rétro-inhibition sur la production de l'IL1 β en plus de son activité bactéricide²⁰.

■ 2.2.3. Les Cellules Dendritiques

Les CD sont au centre de l'interaction entre le système immunitaire inné et adaptatif. Elles ont une capacité de phagocytose cependant leur rôle majeur en tant que cellule présentatrice d'antigène (CPA) est d'initier l'activation et la polarisation des LT. Différents types de CD ont été décrits, les CD myéloïdes ou conventionnelles et les CD plasmacytoïdes (CDp). Les CDp sont plus

impliquées dans la réponse antivirale par la production d'interféron (IFN) de type I, elles peuvent agir comme CD auxiliaires. Les CD conventionnelles sont celles qui vont principalement interagir avec les LT naïfs. Elles détectent les pathogènes environnants par certains récepteurs de l'on appelle les Toll-Like Receptor (TLR) (Figure 3). Ils sont présents aussi bien à la surface de la CD, tels que les TLR 1, 2, 4, 5 et 6, ou dans des endosomes pour les TLR 3, 7, 8 et 9. Les TLR membranaires permettent l'interaction avec certains constituants bactériens tels que le LPS pour le TLR4 ou la flagelline pour le TLR5. Les TLR intracellulaires servent de senseurs pour les constituants internes aux pathogènes (tels que l'ADN ou l'ARN) qui sont relargués lors de la phagocytose. L'activation de ces récepteurs induit une cascade de signalisation médiée par le Nuclear Factor-Kappa B (NFκB) entraînant alors la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (figure 3). Il a été montré que l'activation et l'expression de molécules de co-activation et de co-inhibition par les CD étaient différentes en fonction du TLR stimulé²¹. Il est également important de prendre en compte que la stimulation simultanée des TLR et d'autres récepteurs membranaires, par exemple des récepteurs aux métabolites extracellulaires, peut impacter l'activation des CD médiée par certains TLR. Kado S. et al., ont ainsi montré que l'activation des AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) modifiait les réponses inflammatoires mises en place par la CD sous activation TLR et que cela dépendait du sous-type de TLR stimulé (TLR3, TLR4 ou TLR8). Les effets observés après activation des AhR était due à une modulation de la signalisation intracellulaire médiée par NFκB et impliquant CDX2²². La stimulation des CD par les TLR, entraîne leur activation et leur maturation, elles vont ainsi pouvoir interagir avec les LT naïfs pour initier la réponse immunitaire adaptative.

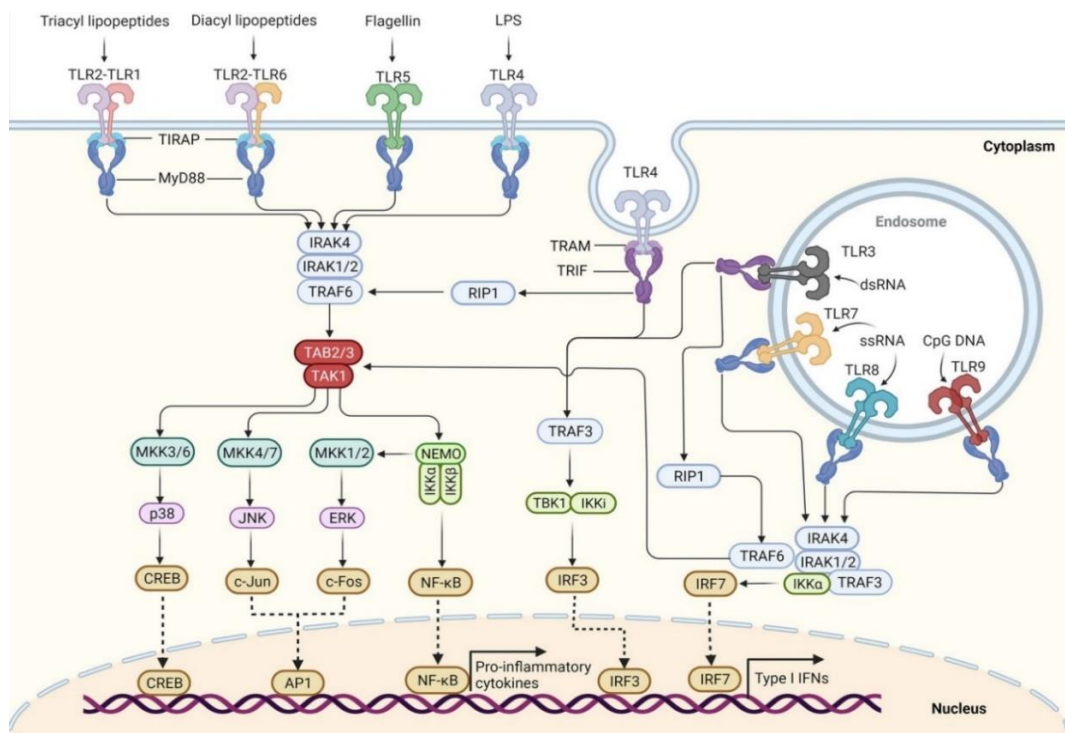


Figure 3 - Représentation des différents TLR présents au niveau de la membrane plasmique ou des vésicules d'endocytose

3. L'immunité adaptative dans la réponse aux infections pulmonaire, axe CD – LT :

Différents types de réponse vont être initiés après contact entre la CD et le LT. Les éléments impliqués dans cette régulation sont présentés dans la partie II. La réponse immunitaire adaptative intervient lorsque l'immunité innée est dépassée. Elle est spécifique de l'antigène et permet également le développement d'une immunité mémoire. La réponse immunitaire adaptative étant spécifique du pathogène identifié, elle entraîne l'expansion du clone du LT capable de reconnaître l'antigène présenté par la CPA. Le contact s'effectue entre la CD mature et activée et le LT naïfs qui sera à l'origine de la polarisation du LT vers les phénotypes suivants :

➤ 3.1. Th1

Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire et principalement dans la réponse aux infections par des pathogènes intracellulaires. Leur polarisation est initiée par la production d'IL-12 par les CD. Celle-ci entraîne une activation du facteur de transcription STAT4, puis du facteur de transcription T-bet permettant la polarisation du LT naïf vers un phénotype Th1. T-bet est également responsable de l'inhibition de GATA-3 bloquant la polarisation vers un phénotype Th2. Les Th1 sont caractérisés par la production notamment de l'IL-2, de l'IFN γ , et du TNF α . Ils jouent un rôle majeur dans l'amplification de l'activité bactéricide des macrophages après qu'ils soient entrés en contact avec le pathogène et qu'ils l'aient phagocyté. Ils favorisent également la polarisation des macrophages vers un phénotype M1. Ils favorisent enfin la différenciation des LT CD8⁺ en LT cytotoxiques, et peuvent de façon plus accessoire exercer eux même une activité cytotoxique.

➤ 3.2. Th2

Les lymphocytes Th2 sont souvent opposés aux lymphocytes Th1 puisqu'ils s'inhibent l'un l'autre. Leur polarisation est induite par des cytokines comme l'IL-4 produite par les CD. Les facteurs de transcription impliqués dans cette polarisation sont STAT6 et GATA3. Par la suite, ils vont être caractérisés par la production des cytokines suivantes : IL-4, IL-13, IL-9 et IL-5. Les Th2 sont impliqués dans les réponses allergiques et dans l'immunité contre les parasites. Ils sont également décrits comme participant à l'activation des Lymphocytes B (LB) et de leur transformation en plasmocytes impliqués dans la réponse humorale. Cependant ce sont plutôt les T_{FH} (Follicular Helper) qui sont les principales cellules assurant ce rôle. Les Th2 sont « pro-tolérologènes » par rapport aux Th1. C'est pour cela qu'ils sont souvent associés à une réponse délétère que ce soit dans la réponse immunitaire anti-cancéreuse ou anti-infectieuse et notamment contre Pa. Cependant, celle-ci est nécessaire pour limiter l'amplification des réponses pro-inflammatoires et l'altération des tissus environnants. Contrairement à ce que nous venons de

décrire, ils orientent la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 et plus particulièrement M2a dit également « pro-fibrosant ». Les Th2 sont également capables d'induire la production de mucus par les cellules caliciformes.

➤ 3.3. *Th17*

La polarisation Th17 est induite par la production d'IL-1 β , d'IL-6 et de TGF β par les CD. Ces cytokines induisent la traduction du facteur de transcription ROR γ et par conséquent, la production d'IL-17 ou d'IL-22. L'IL-21 et l'IL-23 permettent l'amplification et la stabilisation de la polarisation induite. A l'inverse, l'IFN γ et l'IL-4 inhibe la polarisation Th17. Ils sont principalement impliqués dans la clairance des bactéries extracellulaires ainsi que des fongiques et pour cette raison, ils sont très présents au niveau intestinal afin de réguler les interactions avec le microbiote. Les Th17 sont pro-inflammatoires. Ils sont capables de stimuler les cellules épithéliales pour augmenter la production de cytokines et de peptides anti-microbiens, comme l' α -defensine au niveau pulmonaire. L'IL-22 a la propriété d'améliorer la réparation des épithéliums en augmentant la prolifération cellulaire. Les Th17 interagissent également avec l'immunité innée et entraînent le recrutement des PNN ainsi qu'une boucle d'amplification de la production d'IL-12 par la CD, permettant le développement d'une réponse Th1 en parallèle.

➤ 3.4. *Treg*

Les LT régulateurs ont pour rôle de réguler la réponse immunitaire pro-inflammatoire. Ils vont inhiber aussi bien les CD (leur maturation) que les fonctions des LT CD4 et CD8. La polarisation vers un phénotype Treg s'effectue par production de cytokines par la CD comme l'IL-2, lorsque celui-ci est produit en faible quantité pouvant ainsi interagir avec son récepteur le CD25, mais également le TGF β . Ils induisent le facteur de transcription STAT5 et FoxP3. L'expression de FoxP3 doit être maintenue au cours du temps, pour ne pas induire une polarisation vers un phénotype Th2²³. Les T régulateurs ont pour rôle d'inhiber la réponse immunitaire et la prolifération des LT effecteurs, ceci est médié par la production de cytokines anti-inflammatoires et notamment de l'IL-10 qui a la capacité d'inhiber les Th1 ainsi que la libération de cytokines pro-inflammatoire par les macrophages. Ils produisent également du TGF β qui a la capacité d'inhiber la production des IgA, les Th1 mais aussi les Th2, et les macrophages et enfin d'inhiber la croissance cellulaire.

➤ 3.5. *Les cellules T_{FH}, les lymphocytes B et les plasmocytes*

Les LB sont activés par les LT_{FH} qui produisent fortement de l'IFN γ et induisent la transformation des LB en plasmocytes capables de produire des immunoglobulines (Ig) et

notamment des Ig de type G (IgG) permettant l'opsonisation des bactéries. Les anticorps produits sont capables de cibler l'ensemble de micro-organismes. Les T_{FH} peuvent également induire la production d'IgE en produisant de l'IL-4 mais aussi d'induire une immunité de type 3 en produisant de l'IL-17 en ainsi de lutter contre les bactéries extracellulaires. Dans l'immunité des muqueuses, les IgA ont une place prépondérante. Elles sont produites par les plasmocytes présents directement dans la muqueuse. L'induction de la production d'IgA est médiée par les T_{FH} produisant de l'IL-5, de l'IL-6, l'IL-10 et de l'IL-21. Les IgA ont un rôle majeur dans l'équilibre entre l'hôte et le microbiote. Elles agissent en limitant l'adhérence des pathogènes à l'épithélium et peuvent à l'intérieur de la cellule épithéliale (lors de la transcytose), neutraliser le LPS et les virus qu'elles rencontrent dans les endosomes.

➤ 3.6. *T CD8*

Les LT CD8 peuvent se différencier en cellules T cytotoxiques. Leurs cibles privilégiées sont les bactéries intracellulaires ainsi que la réponse dirigée contre les virus. Ces cellules nécessitent beaucoup plus de signaux de co-stimulation que les LT CD4, les CD exprimant en forte quantité les molécules B7 sont capables d'induire la réponse cytotoxique des CD8, en stimulant la production d'IL-2 par la cellule T elle-même. Si ces signaux sont insuffisants les T CD4 vont venir amplifier cette réponse en induisant une boucle d'amplification de l'activation de la CD mais également en produisant de l'IL-2. Le T cytotoxique cible les cellules présentant par l'intermédiaire du CMHI des fragments peptidiques de pathogènes, et induisent l'apoptose de la cellule grâce au système perforine/granzyme.

II. Immunomodulations médiées par les métabolites et impact sur la polarisation T

La stimulation des cellules T et la polarisation vers un phénotype de T helper particulier nécessitent trois signaux dérivés des CD, présentés sur la figure 4 :

- La stimulation antigénique aussi appelée « priming »
- L'expression de signaux de co-stimulation mais également de co-inhibition présents à la surface de la CD qui sont dépendants de sa maturation (détaillés sur la figure 5).
- La production de cytokines par la CD influençant la polarisation.

La stimulation des cellules T et la polarisation vers un phénotype de T helper particulier nécessitent trois signaux dérivés des CD. Ainsi, le signal 1 correspond à la reconnaissance spécifique de l'antigène présenté par le CMH de classe II, par le récepteur des cellules T (TCR). La présentation des peptides antigéniques, nécessite au préalable l'internalisation et la digestion du pathogène ayant interagi avec les PRR (Pattern recognition receptor) ayant reconnu des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) ou des facteurs tissulaires inflammatoires (TFs). Le signal 2 est le signal de co-stimulation, principalement médié par le CD80 et le CD86 qui sont exprimés par les cellules dendritiques matures (après stimulation de TLRs par exemple) et reconnus par le CD28 exprimé par les LT. L'absence de ce 2^{ème} signal entraîne une anergie du LT. Le signal 3 est le signal de polarisation qui est médié par divers facteurs solubles tels que les cytokines. La nature du signal 3 dépend de l'activation de PRRs particuliers par les PAMPs ou les TFs. Nous développerons par la suite, les signaux 2 et 3 qui intègrent les différents facteurs environnementaux de la DC.

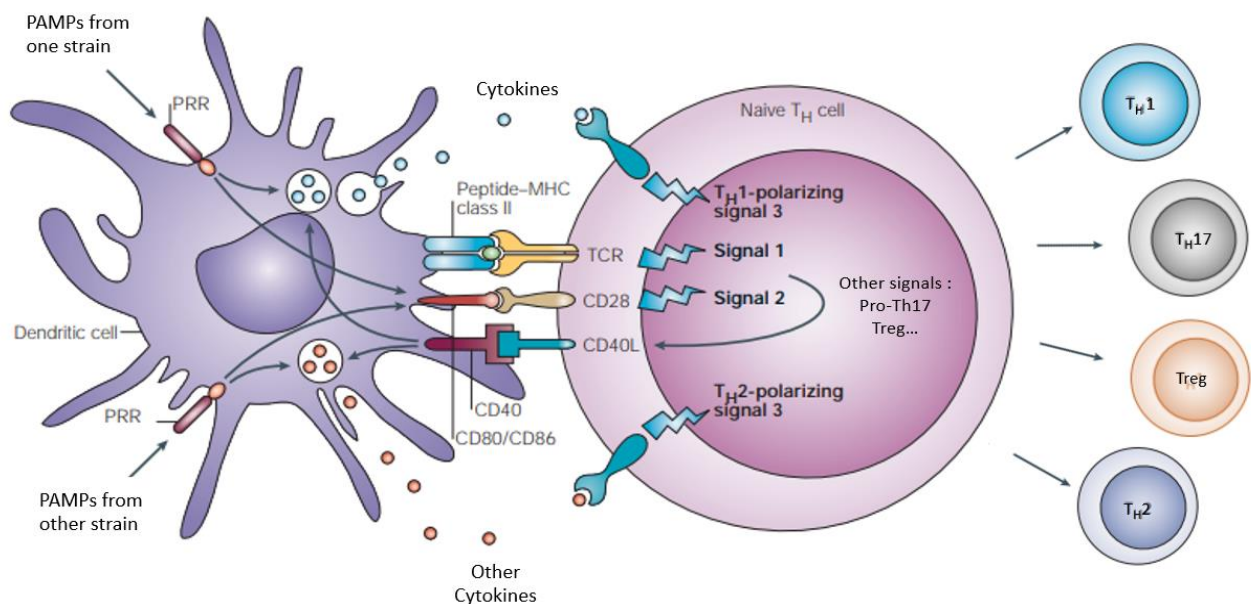


Figure 4 - Synthèse des 3 signaux orientant la polarisation des LT après stimulation par un pathogène

1. Signal 2 – Molécules de co-stimulation et co-inhibition

Un certain nombre de signaux de co-stimulation et de co-inhibition ont été décrits (fig 5). L'équilibre entre ces signaux module la réponse immunitaire, les signaux de co-stimulation vont entraîner une polarisation du LT vers des phénotypes Th1, Th2, Th17 ou autres, dépendant des cytokines produites par la CD, à l'inverse les points de contrôles inhibiteurs permettent d'éviter une réponse pro-inflammatoire dérégulée, soit en inactivant les T effecteurs soit en induisant la génération de Tregs. Ainsi, une forte expression des molécules de co-inhibition ou la diminution de l'expression de l'ensemble de marqueurs de co-activation et de co-inhibition à la surface des CD est en faveur d'une polarisation vers un phénotype Treg, entraînant une immunosuppression. L'activation de la CD va entraîner notamment une augmentation de l'expression du CMHII mais également de marqueurs de co-stimulation que sont le CD40 et le CD80/CD86 aussi appelé B7-1/B7-2. En réponse à l'augmentation de ces marqueurs de co-activation, une augmentation de l'expression du du Programmed Death-Ligand (PD-L)1, molécule co-inhibitrice, est également observée.

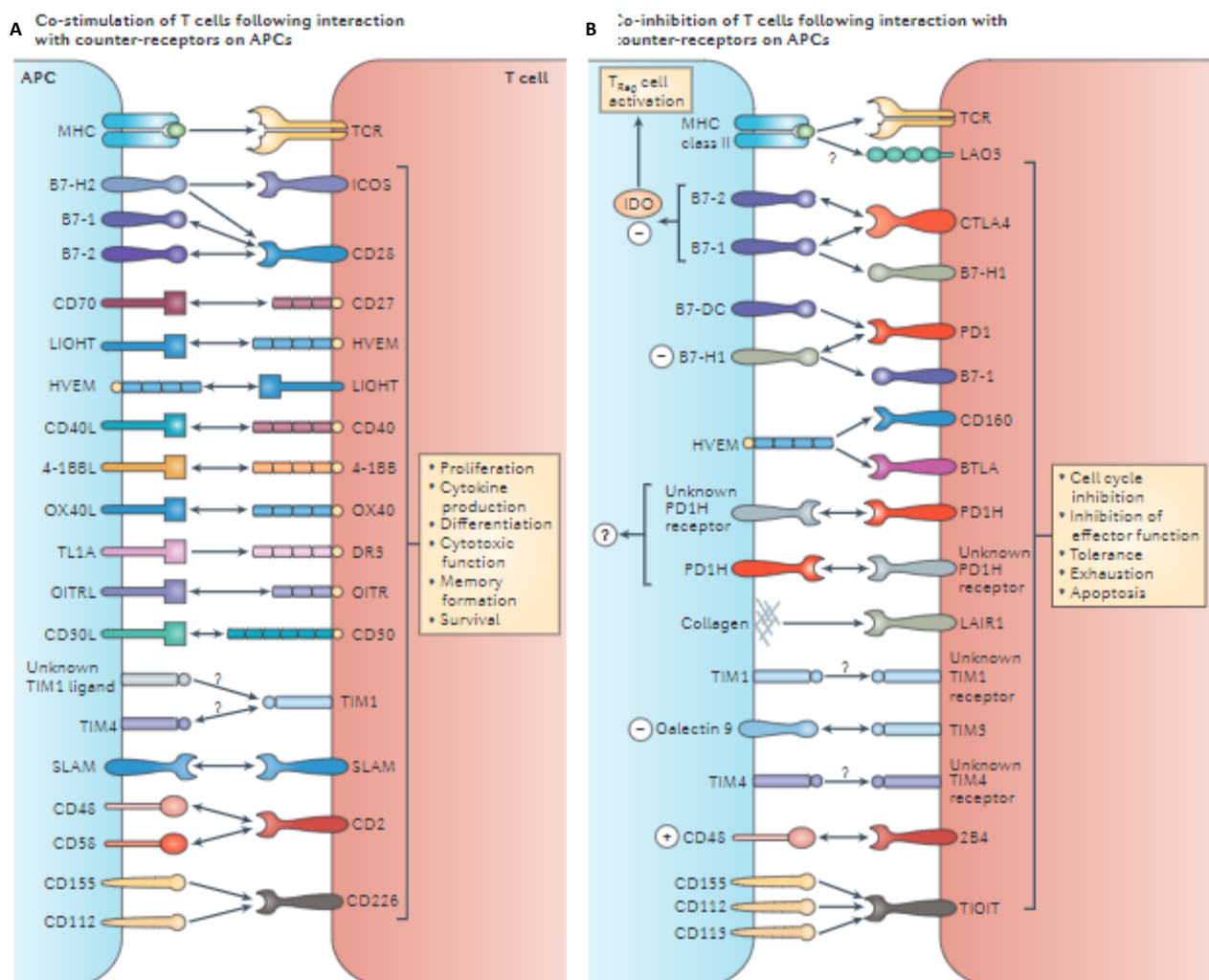


Figure 5 - Présentation de l'ensemble des molécules de co-activation (A) et de co-inhibition(B) impliquées dans la modulation de l'activation et de la polarisation des LT par les CD

2. Signal 3 – cytokines polarisantes

La présentation antigénique (signal 1) et de co stimulation (signal2) vont être déterminant dans l'activation des LT. La nature de la polarisation T va quant à elle fortement dépendre des cytokines produites par la CD, résumées sur la figure 6. Les cytokines vont entraîner la traduction de facteurs de transcription spécifiques de chaque type de Th, induisant la polarisation et la production de cytokines par les LT eux-mêmes.

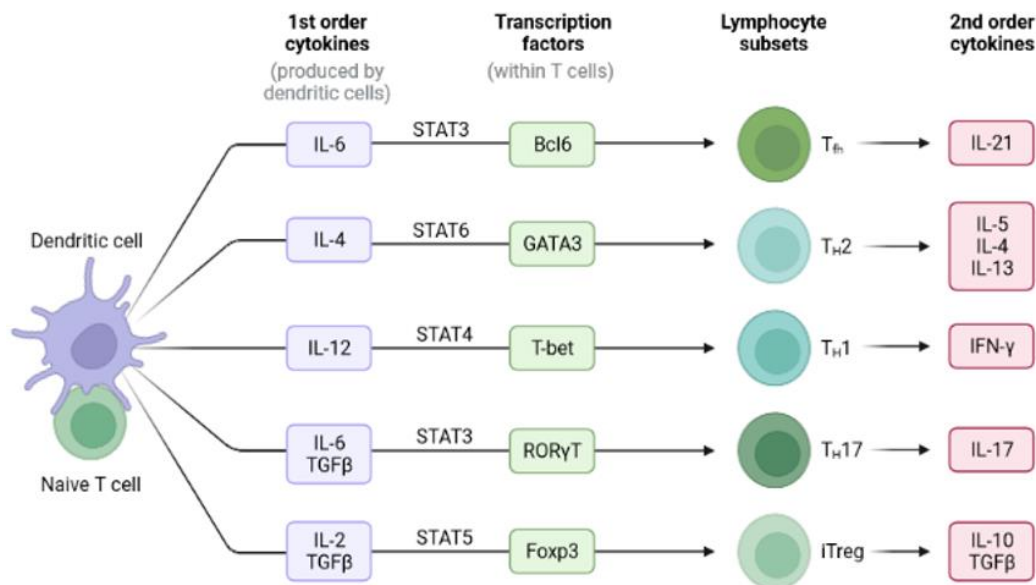


Figure 6 - Synthèse des différentes cytokines produites par les CD à l'origine de l'activation de facteurs de transcription induisant la polarisation du LT, puis présentation des cytokines produites par les différents sous types de LT.

3. Un nouveau signal à prendre en compte, médié par les immunométabolites

Enfin, les métabolites peuvent moduler l'immunité, ils sont alors appelés métabolites immunomodulateurs ou immunométabolites. Ceux-ci peuvent agir aussi bien au niveau de la CD en modulant l'expression membranaire de molécule de co-inhibition / co-stimulation ainsi que le type de cytokines produites, mais également au niveau du lymphocyte T en bloquant sa maturation, sa fonction ou en induisant une cytotoxicité²⁴. Les immunométabolites produits par les bactéries ont principalement été décrits au niveau du microbiote intestinal, produit par les bactéries commensales de la flore intestinale et jouant un rôle majeur dans le développement et l'équilibre du système immunitaire de l'hôte. Nous avons ainsi réalisé une revue de l'ensemble des métabolites actuellement décrits intervenant dans l'interaction entre l'immunité de l'hôte et le microbiote qui a été publiée en 2021 dans *Metabolites*.



Review

What We Know So Far about the Metabolite-Mediated Microbiota-Intestinal Immunity Dialogue and How to Hear the Sound of This Crosstalk

Clément Caffaratti ^{1,†} , Caroline Plazy ^{1,2,3,†}, Geoffroy Mery ^{1,4}, Abdoul-Razak Tidjani ¹, Federica Fiorini ³, Sarah Thiroux ¹, Bertrand Toussaint ^{1,2,3}, Dalil Hannani ^{1,*‡} and Audrey Le Gouvellec ^{1,2,3,*‡}

¹Faculty of Medicine, CNRS, Grenoble INP, CHU Grenoble-Alpes, University Grenoble Alpes, TIMC (UMR5525), 38000 Grenoble, France; clement.caffaratti@univ-grenoble-alpes.fr (C.C.); cplazy@chu-grenoble.fr (C.P.); gmery@chu-grenoble.fr (G.M.);

abdoul-razak.tidjani@univ-grenoble-alpes.fr (A.-R.T.); Sarah.Thiroux@univ-grenoble-alpes.fr (S.T.); btoussaint@chu-grenoble.fr (B.T.)

²Service de Biochimie Biologie Moléculaire Toxicologie Environnementale, UM Biochimie des Enzymes et des Protéines, Institut de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble-Alpes, 38000 Grenoble, France

³Plateforme de Métabolomique GEMELI-GEIM, Institut de Biologie et Pathologie, CHU Grenoble-Alpes, 38000 Grenoble, France; ffiorini@chu-grenoble.fr

⁴Department of Infectiology-Pneumology, CHU Grenoble-Alpes, 38000 Grenoble, France

* Correspondence: dalil.hannani@univ-grenoble-alpes.fr (D.H.); alegouvellec@chu-grenoble.fr (A.L.G.); Tel.: +33-(0)4-76-63-75-58 (D.H.); +33-(0)4-76-63-76-76 (A.L.G.)

† Co-first authors.

‡ Co-last authors.



Citation: Caffaratti, C.; Plazy, C.; Mery, G.; Tidjani, A.-R.; Fiorini, F.; Thiroux, S.; Toussaint, B.; Hannani, D.; Le Gouvellec, A. What We Know So Far about the Metabolite-Mediated Microbiota-Intestinal Immunity Dialogue and How to Hear the Sound of This Crosstalk. *Metabolites* **2021**, *11*, 406. <https://doi.org/10.3390/metabo11060406>

Academic Editor: Silas G. Villas-Boas

Received: 17 May 2021

Accepted: 16 June 2021

Published: 21 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This

article is an open access article

distributed under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license ([https://creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[https://creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

4.0/).

Abstract: Trillions of microorganisms, termed the “microbiota”, reside in the mammalian gastrointestinal tract, and collectively participate in regulating the host phenotype. It is now clear that the gut microbiota, metabolites, and intestinal immune function are correlated, and that alterations of the complex and dynamic host-microbiota interactions can have deep consequences for host health. However, the mechanisms by which the immune system regulates the microbiota and by which the microbiota shapes host immunity are still not fully understood. This article discusses the contribution of metabolites in the crosstalk between gut microbiota and immune cells. The identification of key metabolites having a causal effect on immune responses and of the mechanisms involved can contribute to a deeper insight into host-microorganism relationships. This will allow a better understanding of the correlation between dysbiosis, microbial-based dysmetabolism, and pathogenesis, thus creating opportunities to develop microbiota-based therapeutics to improve human health. In particular, we systematically review the role of soluble and membrane-bound microbial metabolites in modulating host immunity in the gut, and of immune cells-derived metabolites affecting the microbiota, while discussing evidence of the bidirectional impact of this crosstalk. Furthermore, we discuss the potential strategies to hear the sound of such metabolite-mediated crosstalk.

Keywords: microbiota; metabolites; immune system; host-microbiota crosstalk; non-targeted metabolomics

1. Introduction

The human body is in a complex equilibrium with its microbial flora, and their synergistic interactions have been and still are the object of intense investigation. In 1991, Dr. Lynn Margulis introduced the concept of “holobiont” in her book “Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation”; according to this definition, the human body can be described as an assemblage of the host and the many species living in or around it [1]. The components of a holobiont are individual species or bionts, while the genomes of these bionts, including the human genome, the virome, the mycobiome, the microbiome, together define the hologenome. For decades, the development of genomic approaches, including

phylogenetic marker-based microbiome profiling and shotgun metagenomics, has enabled a descriptive characterization of the microbiota composition and numerous links between its composition and diseases [2,3]. In adulthood, more than 1000 bacterial species have been identified, which shows the complexity of this large microbial community. Metagenomics gives access to the characterization of the microbiota at the taxonomic level, and at the level of the putative functions encoded by the numerous microbial genes. The recent advent of systems biology makes it possible to consider functional analysis (also simply called function) of the microbial community. This means, in particular, to quantify the metabolic activity, thanks to the measurement of RNA, by metatranscriptomics [4], of proteins, by metaproteomics [5], and finally, more recently, of metabolites, by metabolomics. Although some of the tools necessary for these integrative studies are still under development, they are essential to better understand the molecular mechanisms involved in symbiosis, but also related to the emergence of disease in the case of dysbiosis.

The human immune system plays an essential role in the development and education of innate and adaptive immunity after birth [6], and in maintaining homeostasis between humans and their resident microbial communities, thereby ensuring that the symbiotic nature of the host-microbe relationship is maintained. At the same time, commensal bacteria profoundly shape immunity [7–9]. The functions of the immune system could even include promoting the growth of beneficial microbes, as well as limiting the growth of harmful microbes, since the same microbe could be harmful or beneficial depending on the context (body sites, physiological state of the host, etc.). The crosstalk between immune cells and the microbiota engages a bidirectional communication, which has been studied for many years. Pattern Recognition receptors, especially Toll-like receptors (TLRs), initially described to recognize microbial signals during infection, are now known to be important players in shaping the gut microbiota and triggering a situation-specific immune response [9]. Recently, researchers have proposed that the interaction between gut microbiota and immunity is highly diverse and dynamic, and have demonstrated the cornerstone role that metabolites play in the evolutionary connection between symbiotic microbes and their hosts [10]. It is therefore important to study the content of gut metabolites and try to better characterize this dialogue (who are the players involved in the production of these metabolites, under what circumstances, and with which effects). According to Goodacre, “Metabolomics experiments aim to quantify all metabolites in a cellular system (cell or tissue) in defined states and at different times, so that the dynamics of any biotic, abiotic or genetic perturbation can be accurately assessed” and he positions metabolomics as an important systems biology approach to study the concepts of supraorganism or holobiont [11]. Despite the difficulty, metabolomics studies have clarified the metabolic profiles in the gut lumen and proved that the gut microbiome strongly influences the metabolome of the colonic lumen [12]. Microbiota-derived metabolites have been identified as components of the human metabolome [13]; some of these are recognized by immune cells via membrane or nuclear receptors and trigger a cascade of events leading to the maintenance of tolerance in the gut or the activation of antimicrobial strategies. These metabolites have a local effect in the gut on intestinal epithelial cells (IEC) or immune cells after diffusion, or are released systemically, impacting many host biological functions [13].

In a healthy state, the gut is a compartmentalized system that separates microbes from the host. Control of the microbiota biomass in the gut lumen relies on the integrity of the epithelial barrier and the effectiveness of the immune system in eliminating incoming pathogens penetrating the lamina propria. However, in this apparently hermetic system, there is constant communication between each of the players. A defective interaction between them is implicated in the pathogenesis, development, or severity of several diseases.

The present contribution attempts to provide a state-of-the-art description of the bidirectional interactions between the gut microbiota and the immune system and focuses on metabolites, defined as small organic molecules, intermediates, and products of an organism’s metabolism (<1.5 kDa). First, we review the most compelling microbiota-related metabolites associated with local or systemic immune modulations and the immune

pathways that are triggered in the gut. Next, we present the traditional strategies used by the immune system to control the biomass and composition of the microbiota. Finally, we discuss the challenges and perspectives of metabolomics strategies and integrative tools in studying the crosstalk between immune cells and microbiota.

2. Microbiota-Derived Metabolites That Modulate Host Immunity in the Gut

The number of metabolites in the gut lumen is currently unknown and includes molecules of dietary, host, and microbial origin. Microbiota-derived metabolites that stimulate or suppress the immune response are either soluble bioactive molecules or membrane-bound compounds. It is already well-known that “immunometabolites”, such as succinate, itaconate, acetyl-CoA, and 2-hydroxyglutarate, to name a few, serve as signal transducers to regulate the immune cell function and disease outcome. Here, we discuss the role of the main gut immunometabolites currently known, and we provide a brief description of the classification, function, and mechanism by which they are involved in immune dysregulation (see the Supplementary Table S1).

1.1. Soluble Microbially-Derived Metabolites Affecting the Immune System

1.1.1. Short Chain Fatty Acids (Propionate, Butyrate, and Acetate)

The most well-known microbiota-related metabolites with immunomodulatory properties are the so-called “short-chain fatty acids” (SCFA), including propionate, butyrate, and acetate. Their production is the result of anaerobic bacterial fermentation of dietary fibers within the intestine and especially within the colon [14]. SCFAs are mainly produced by *Bacteroidetes* and *Firmicutes* phyla, in particular, acetate and propionate from the former and butyrate from the latter [14,15]. SCFAs average concentrations are 70–140 mM in the proximal colon versus 20–70 mM in the distal colon, and vary according to the presence of infection or inflammation [14–16] (Figure 1). These variations highlight the significant and rapid absorption of SCFA by colonocytes after their production via passive diffusion or via some transporters, such as MCT (Monocarboxylate Transporter) and SMCT1 (Sodium-coupled Monocarboxylate Transporter 1) [17]. Their primary role after absorption is to serve as an energy substrate for ATP generation in the tricarboxylic acid cycle (TCA), especially for the colonocytes [18]. Hepatocytes are the second main consumers, and only a small part of SCFA reach the systemic circulation, especially for propionate and butyrate [19]. Indeed, the blood concentrations are 25–250 μM for acetate, 1.4–13.4 μM for propionate, and 0.5–14.2 μM for butyrate [20]. At a cellular level, they exert a major role on gene expression through HDAC (Histone DeAcetylase) inhibition and HAT activation (Histone acetyltransferase) [21,22]. SCFA signaling through GPCRs (G protein-coupled receptors), especially three types of GPCRs: FFAR2 (GPR43), FFAR3 (GPR41), and the niacin/butyrate Receptor (GPR109A), which affect chemotaxis, apoptosis, proliferation, and cell differentiation [23–27]. SCFAs are necessary for intestinal homeostasis and for IECs growth [28]. They are also critical for maintaining intestinal barrier integrity through hypoxia-inducible factor 1 alpha (Hif1- α) stabilization [29]. SCFAs can lead to opposite effects on intestinal stem cell growth, depending on their concentration. Lower butyrate concentration in intestinal villi crypts compared to apex appears to inhibit the proliferation of intestinal stem cells through the activation of the transcription factor: FOXO3 [28].

Among SCFAs, butyrate is the main immunomodulatory metabolite, displaying immunosuppressive properties [30]. At the level of adaptive immunity, butyrate promotes regulatory T-cells (Tregs) and IL-22 production through several mechanisms [31,32]. First, by acting as an HDAC inhibitor, butyrate increases FoxP3 expression [33,34]. It also activates indoleamine 2,3 dioxygenase 1 (IDO-1) (that leads to tryptophan deprivation and promotes the production of the immunosuppressive metabolites kynurenine, among others), and aldehyde dehydrogenase (ALDH)1A2 (which is involved in acid retinoic metabolism), two enzymes promoting the conversion of naïve T-cells into FoxP3+ Tregs [33]. Finally, it suppresses the conversion of naïve T-cells into proinflammatory interferon- γ (IFN- γ)-producing cells [33]. It also inhibits Dendritic Cell (DCs) activation/maturation

via GPR109A. Butyrate-induced tolerogenic DCs further contribute to immunosuppression through IL-10 production, generation of Tregs, and decrease in T helper (Th)17 [35–37]. At the level of innate immunity, butyrate promotes macrophage differentiation, and antimicrobial activity through HDAC3 inhibition that leads to increased ROS production. Hence, butyrate promotes through macrophages the reduction of bacterial translocation, contributing to prevent gut inflammation [38,39]. Due to their antiinflammatory and HDAC inhibitory properties, SCFAs are critical for health. For instance, their properties are implicated in Inflammatory Bowel Diseases, especially in Colitis [40]. Finally, in certain pathophysiological conditions, SCFA mediated immunomodulation is not restricted only to antiinflammatory properties, but it also depends on their concentration, cell type, and metabolic state. Several studies have described the immunostimulatory properties of SCFAs [41]. SCFAs have been shown to increase IL-18 production by IECs, as well as proinflammatory cytokines and chemokines, such as TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), IL-6, CXCL1 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 1), and CXCL10 by colon epithelial cells in vitro [42,43] (Figure 1). SCFAs improve even the generation of Th1 and Th17 T lymphocytes in an infectious context [44].

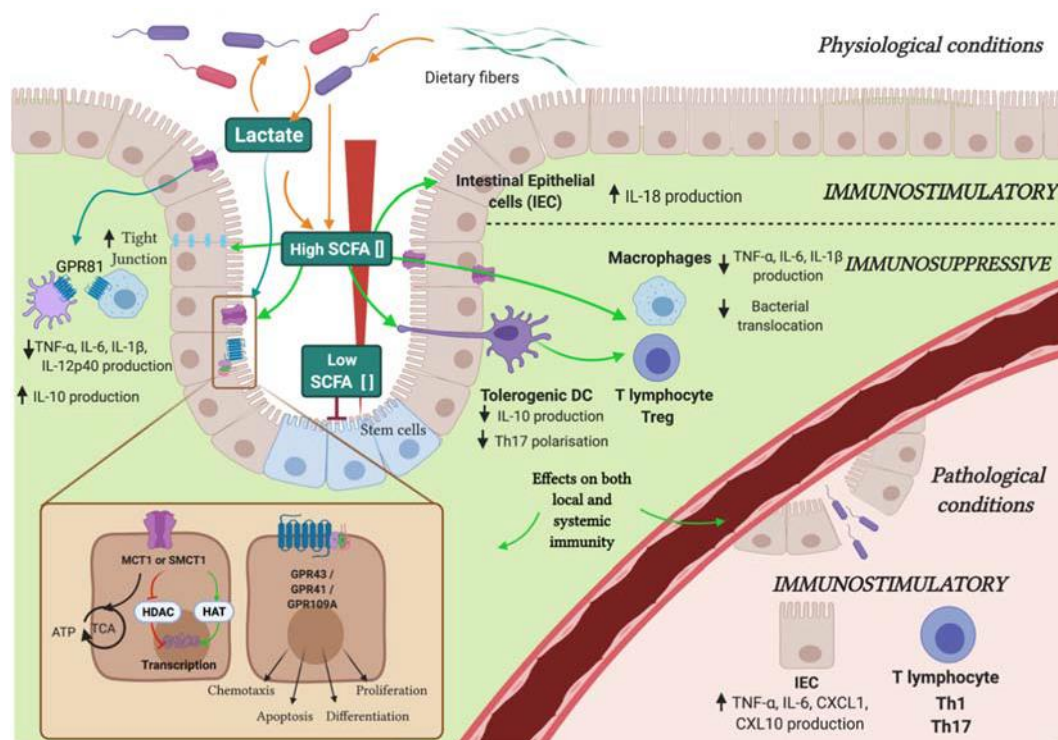


Figure 1. Role of short chain fatty acids (SCFAs) and lactate in immune regulation. SCFAs are produced from bacteria anaerobic fermentation of carbohydrates and dietary fibers. SCFAs have different modes of action on both local and systemic immunity. In physiological conditions, they regulate the intestinal barrier function by upregulation of the expression of the tight junction. Then, they play an important role in T-cell functioning, via regulation of G-protein-coupled receptors (GPR43, GPR41, GPR109A) and inhibition of HDAC (i.e., histone deacetylase). SCFAs regulate dendritic cells (DC) in the differentiation of T-cells, and Treg, Th1, and Th17 generation in different cytokine environments. Moreover, they inhibit the production of proinflammatory cytokines (e.g., TNF- α , IL-6, IL-1 β) from intestinal macrophages and induce the production of interleukin-18 (IL18) from intestinal epithelial cells (IEC). In pathological conditions, SCFAs activate the production of proinflammatory cytokines and chemokines, such as Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), CXCL1, and CXCL10, as well as increasing the production of Th1 and Th17 T lymphocytes. Lactate is a signal molecule of GPR81 and plays an important role in suppressing colonic inflammation.

1.1.2. Lactate

In addition to the common SCFAs, lactate, which is a hydroxy-carboxylic acid, is derived from food and easily produced by intestinal lactic acid bacteria (LAB), *bifidobacteria*, and other anaerobes [45–47] (Figure 1). In order to stabilize the pH and to preserve the balance between the different microbial populations and metabolism of the colonic microbiota, the concentration of lactic acid is closely regulated in the gastrointestinal tract by two mechanisms. The first one is the cycle of production and consumption of lactate, which is used as an energy substrate by other microbiota bacteria. The second one involves the metabolization of lactic acid into SCFAs, especially propionate and butyrate, which contributes to decrease its concentration in the intestinal lumen. Lactate concentration is ranging from 5 to 10 mM in the intestinal lumen and increases in patients suffering from gastrointestinal disorders [48,49]. Microbial communities with low numbers of lactate-utilizing bacteria are inherently less stable, and therefore, more prone to lactate-induced perturbations [50]. Interestingly, on innate immunity, lactate acts as a signaling molecule on GPR81, a cell-surface G-protein-coupled receptor. The GPCR-mediated signaling of metabolites is not covered in the present review, as it has already been extensively reviewed in [51]. GPR81-mediated signaling in colonic DCs and macrophages plays an important role in suppressing colonic inflammation [52]. Lactate also induces downregulation of myeloid cell activation mediated by Lipopolysaccharide (LPS) and leads to a decrease in the production of TNF- α and IL-6 [53]. Moreover, it promotes M2 polarization of macrophages producing a high level of IL-10 and a decrease in the production of IL-12 [54]. Furthermore, Lactate is internalized into the cell by transmembrane proteins, such as MCT-1/4, SLC5A12, and SCL5A8 (subtypes of SMCT channel), and it modulates the gene expression induced through the inhibition of HDAC activity (Figure 1). Lactate is also responsible for metabolic reprogramming, inducing inhibition of glycolysis [55]. In addition to promoting an immunopermissive environment by targeting immune cells present in lamina propria, lactate plays a critical role in regulating IECs inflammatory activity. It inhibits the activation of IECs depending on TLRs and IL-1 β . On adaptive immunity, lactate has been shown to decrease the motility of both CD4+ and CD8+ T-cells and the cytolytic activity of CD8+ T-cells [56]. Lactic acid also decreases the proliferation and effective functions of effector T (Teff) cells, and at the same time, increases the conversion of naive to Tregs [57]. Moreover, lactic acid has been implicated in the fight against the development and the aggravation of some pathologies. Lactic acid produced by *lactobacilli* has shown to be essential in regulating inflammation-induced during injury of the small intestine by indomethacin. A metabolomics study has been shown a difference in the concentration of some metabolites in the blood of patients suffering from celiac disease, and notably an increase of the concentration of lactate, which highlights an alteration of the energy metabolism [58]. Lactate may rise to high concentrations (90 mM) in the colonic lumen of patients suffering from Ulcerative Colitis (UC) [48]. In line with this, it has been shown that the presence of lactate triggers *Rorc* and *Il17* expression by naïve and polarized CD4+ T-cells upon in vitro activation. These data suggest that high lactate concentration might promote IL-17-driven inflammation in those diseases.

1.1.3. Succinate

Similar to lactate, succinate, a dicarboxylic acid, is produced in large amounts during bacterial fermentation of dietary fibers [15]. Succinate is a metabolic intermediate of the tricarboxylic acid (TCA) cycle; therefore, it is produced by both bacteria and immune cells. However, as Germ-free (GF) mice have a low amount of succinate in the gut lumen, microbes seem to be the principal producers within the gut [59]. Succinate concentration is very low, ranging from 1 to 3 mM in the intestinal lumen and feces [60]. This is mainly explained by the succinate metabolization into SCFAs, particularly for the production of propionate. Several studies have highlighted the role of succinate as a proinflammatory mediator. In particular, the expression of succinate receptor 1 (SUCNR1, also known as GPR91) on macrophages is associated with an M1 phenotype and a type I response upon

stimulation [61]. Upon activation, macrophages change their metabolism to produce and secrete a significant amount of succinate. They simultaneously upregulate SUCNR1, which acts as an autocrine or paracrine sensor for extracellular succinate to subsequently enhance IL-1 β production via Hif-1 α activation [62]. Hif-1 α is a transcription factor that senses and responds to the metabolic state of the cell, acting as a key mediator in mounting both innate and adaptive immune responses [63]. Extracellular succinate also triggers the SUCNR1 receptor expression on DCs, acts as a chemotactic factor, and participates in their activation via TLR3 and TLR7 [64,65]. Finally, it is also reported that succinate is a potent activator of intestinal tuft cells and leads to the activation of type 2 innate lymphoid cells in the lamina propria and the remodeling of the small intestine [66–68]. A dysbiosis, including the reduction of succinate-consuming bacteria, can lead to both succinate accumulation and lower SCFAs production within the gut lumen, as observed mainly in patients with a high-fat diet or after antibiotic treatment [69]. Succinate accumulation seems to play a role in acute gut inflammation and may participate in the maintenance of inflammatory bowel disease (IBD) [61,70]. A recent review gathered evidence suggesting that dysbiosis and the imbalance in the SCFA/succinate ratio is one of the causes of IBD [71].

1.1.4. B Vitamins

B vitamins (VB) form a group of hydrosoluble micronutrients counting eight members. Interestingly, though dietary intake is the principal source, the microbiota plays a large part in the daily intake of VB, either by modifying dietary precursors or by *de novo* synthesis. Most of these modifications cannot be performed by the mammalian host. Genes related to enzymes involved in VB synthesis are scattered across bacterial and yeast genomes [72]. Early genomic research for these pathways in the digestive tract found that half of the bacteria lacks at least one gene for their synthesis [73]. Producing an accessible and active form of VB involves multiple actors among the microbiota, to finally produce the VB benefiting the host [74]. Thus, VB represents an explicit example of a symbiosis both within a polymicrobial community [75], and between the microbiota and the host. As the links between microbes and VB become clearer, the synthesis of each vitamin can now be related to specific bacteria. VB-producing strains evolve through life; for instance, in early childhood, VB2, VB6, and VB9 producing bacteria strains predominate, whereas VB1 and VB5 producing strains are more prevalent in older ages [76]. The discovery of conserved microbial phenotypes in human populations, known as enterotypes, has also led to the findings that enterotypes are specialized in the production of some VB rather than others, without further mechanistic explanation [77,78]. All VB are enzyme cofactors involved in various pathways, ranging from fatty acid metabolism to DNA repair, and their deficiency leads to serious systemic manifestations, which, for most of them, led to their discovery. The indisputable influence of such vitamins on immunity has been extensively reviewed elsewhere [79], but we briefly summarize here the main described VB effects on immunity reviewing the most up-to-date articles (Figure 2).

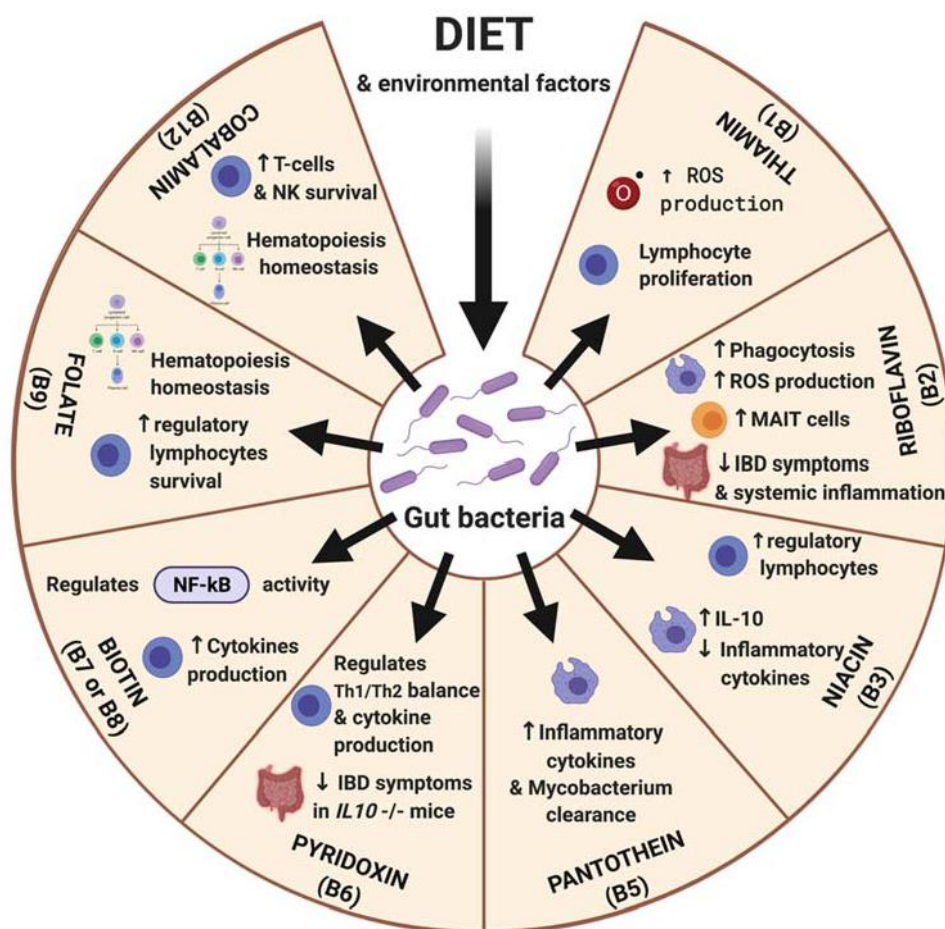


Figure 2. Overview of the impact of the different B vitamins on immunity. The main source of VB is the dietary intake, together with modification of dietary precursors or de novo synthesis carried out by the microbiota. As VB plays a role as precursors or as enzyme cofactors in numerous metabolic reactions, they impact the regulation of immune homeostasis through the metabolism, which is summarized here for each VB. MAIT, mucosa-associated invariant T lymphocytes; IBD, inflammatory bowel disease; ROS, reactive oxygen species).

Vitamin B1

Thiamine (VB1) is one of the first VB discovered, due to the particularly notable symptoms of its deficiency, such as Beriberi disease or organ-related diseases, mostly in the central nervous system, as seen in Wernicke's encephalopathy or optic nerve disorders. VB1 participates in aerobic cellular energy production through amino-acids and alpha keto-acids catabolism, and its derivative, thiamine pyrophosphate (TPP), acts as a cofactor in pyruvate dehydrogenase and the TCA cycle. VB1 comes from diet, and microflora in the large intestine is easily internalized thanks to high-affinity thiamine transporter-1 and -2 (SLC19A2 and SLC19A3) [80]. The TPP, the active form of VB1, which is transformed by the gut bacteria, is an important cofactor for enzymes, such as pyruvate dehydrogenase, alpha-ketoglutarate dehydrogenase, and transketolase [81]. Finally, many factors influence thiamine absorption, such as alcoholism and digestive pathogens, but also multiple other factors independent of the microbiota [82,83]. From the immunological standpoint, VB1 plasmatic concentrations seem to be inversely linked to immune cell counts (Figure 2). Malignant lymphocytic proliferations have been correlated to a higher risk of VB1 deficiency, probably due to intense VB1 consumption [84]. Inversely, patients with low CD4⁺ T-cells in HIV seem to have higher VB1 blood concentrations, even in the early stages of the disease [85], suggesting VB1 consumption requirement for lymphocyte production, activation, or survival, as demonstrated in other animals [86].

Vitamin B2

Riboflavin (VB2) is the precursor for two coenzymes, the flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD), that are required, among others, in the metabolism of niacin (VB3) and pyridoxine (VB6), respectively. VB2 is naturally accessible from a wide variety of foods (e.g., eggs, organ meats, lean meats, and milk are particularly rich in riboflavin). Its production, however, is enhanced by LAB residing in the large intestine, where the VB2 is efficiently absorbed by colonocytes. Riboflavin blood levels correlate with LAB quantity [87], with microbiota diversity and its enterotype [88], as well as the host's nutritional status [89]. It was shown that VB2 supplementation in mice led to a decrease in proinflammatory cytokines under septic conditions and obesity-associated inflammatory states [90], notably by decreasing TNF- α production by macrophages (Figure 2). VB2 also enhances the macrophage's production of reactive oxygen species (ROS) and their phagocytic activity [91]. These effects could be a result of NF- κ B pathway tampering, or secondary to the proteasome inhibitory properties of VB2 [92]. In addition, human mucosal-associated invariant T (MAIT) cell receptors (TCRs) recognize bacterial riboflavin pathway metabolites through the MHC class 1-related molecule MR1 [93]. MAIT cells kill host cells infected with bacteria and yeast, and secrete soluble mediators, such as TNF- α , IFN- γ , IL-17, etc. The fluctuations of MAIT, both in blood samples and intestinal lumen, are actively studied in the field of IBD [94]. In human diseases, a three week riboflavin supplementation in Crohn patients is beneficial on clinical symptoms, systemic inflammation, and improved the composition of the gut microbiota, underlying its therapeutic potential [95,96].

Vitamin B3

Niacin (VB3) is the precursor of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), a crucial electron transporter in central metabolism, oxidative stress control, mitochondrial homeostasis, and senescence regulation. Interestingly, NAD is metabolized through different possible pathways, which often imply transkingdomal cooperation [97], sometimes relying on VB3 intake and sometimes on the kynurenine pathway [98,99]. VB3 directly activates GPCR109A, which also recognizes butyrate, leading to similar effects, notably on lipid regulation. Reintroduction of *Akkermansia muciniphila* in GF mice partially restored the lack of nicotinamide-producing species [100]. Another study suggests the involvement of *Methylobacteriaceae* in VB3 synthesis [101]. VB3 and derivatives are known to participate in macrophage polarization, towards proinflammatory or unconventional phenotypes depending on the stimuli [102]. VB3 also tampers the reactive oxygenated species production both by macrophages and neutrophils, increasing survival in LPS induced sepsis models in mice [103], along with the neutrophils' myeloperoxidase production and recruitment [104,105]. In preclinical models of colonic inflammation, activation of GPCR109A seems to correlate with the abundance of Treg in the gut lamina propria and the production of IL-10 [37], and with intestinal innate lymphoid cells polarization [106] (Figure 2).

Vitamin B5

When considering pantothenic acid (VB5), evidence is scarcer. Because of its wide distribution in nutritional sources, deficiency in pantothenic acid is very uncommon. However, its relevance in cell metabolism is indisputable, as a precursor of the coenzyme CoA and as a catalyzer for TCA mediated oxidation reactions in fatty acids metabolism. Pantothenic acid has been linked to inflammatory homeostasis. Firstly, metabolic pathways allowing this vitamin to be synthesized into coenzyme CoA are strongly expressed in white blood cells, and the tampering of these pathways leads to unsolicited inflammatory reactions. Panthoteine metabolism is relevant to cellular adhesion and polynuclear efficacy, and oxidative stress control, among others [107]. In both isolated macrophages and infected mice, supplementation of VB5 helped clearance of *Mycobacterium tuberculosis* and promoted antibacterial cytokine production [108]. Finally, Ghosal et al. developed a murine model with a knockout (KO) for the gene coding for the intestinal transporter of VB5 and biotin (VB8) (SLC5A6) and shown histopathological alterations associated with a high mucosal

inflammation of the colon of those KO mice [109]. This intestinal inflammation was reduced by supplementing the lacking vitamins to the mice's diets [110].

Vitamin B6

Pyridoxine (VB6) and its active derivatives, pyridoxal, and pyridoxamine, assist as cofactors to various reactions (e.g., pyridoxal 5^tphosphate in amino acid metabolism, but also carbohydrate and lipid metabolic pathways, kynurenine metabolism, and to VB3 synthesis). Isolated VB6 deficiency is rare, frequently associated with other deficiencies, and it manifests itself by a large array of nonspecific symptoms [111]. As with other VB, the different metabolic pathways required to synthesize the bioactive forms of VB6 are shared by the microbiota [112]. The most notable pathways can be, for example, found between *Bacillus subtilis* and in *Escherichia coli* [113]. Studies on VB6 supplementation in human patients without underlying deficiency failed to strongly link the flora and the VB6 uptake [114]. In carps, a VB6 depleted diet accentuated the transcription of proinflammatory cytokines in all segments of the digestive tract [115]. In patients with rheumatoid arthritis (RA), inflammatory biomarkers, such as TNF- α or C-Reactive Protein, were inversely correlated to VB6 level in sera [116], but again VB6 medication in non-deficient subjects showed no beneficial effect [117]. A similar observation was made in patients with critical illness [118,119]. Curiously, in murine models of IBD with a KO in IL-10, both deficiency and supplementation of VB6 had beneficial results on gut inflammation [120]. VB6 is likely to be involved in regulating the NF- κ B pathway [121], and lymphocyte polarization in favor of a Th1 mediated immune response, rather than Th2 [122–124]. However, the participation of VB6 derivatives in the kynurenine and sphingosine pathways complicates the understanding of its genuine implications in human health and microbiota. At this time, it seems possible that VB6 is required for a stable, non-inflammatory baseline state, and perhaps to limit the cytokine storm in COVID-19 [125], but further evidence is needed.

Vitamin B8

Biotin (VB8) is the vitamin of the B group with the most admitted relevance in cellular health. It catalyzes up to six vital carboxylases involved in numerous roles, ranging from fatty acids to amino-acid metabolism [126]. The understanding of the role of VB8 on immune health, and by extension, the consequences of VB8 deficiency or supplementation, is yet still beginning and has been reviewed elsewhere [127]. Notably, its possible involvement in the NF- κ B pathway regulation holds high expectations in a potential anti-inflammatory process. Recently, this hypothesis has been strengthened by Skupsky et al., which showed a lowered NF- κ B activity and histological signs of mucosal inflammation in the colon of biotin-supplemented mice [128]. This observation concurs with a previously mentioned study, exploring the supplementation of VB5 and VB8 [110]. Another team focused on the properties of VB8 on human T-cell population, and showed that VB8 deficient growth media promoted higher titers of proinflammatory cytokines, such as IFN- γ and IL-17, enhanced the T-cell polarization towards Th1 and Th17 proinflammatory profiles, and reduced the proportion of Treg-cells through the rapamycin-mTOR pathway [129].

Vitamin B9 and B12

Folate (VB9) and cyanocobalamin (VB12) are often studied together. In a human randomized trial, dietary uptake of probiotic species (an association of *Bifidobacter* spp. and *Lactobacillus* spp.) was associated with higher blood titers of VB9 and VB12, without any additional supplementation of these vitamins [130]. Folate is an essential cofactor for synthesizing amino acids, nitrogenous bases, and ribonucleoside, which is why antifolates are commonly used in cytotoxic chemotherapies and anti-infectious treatments. It is also involved in mitochondrial RNA metabolism [131]. VB12 also catalyzes the synthesis of amino acids, both from the cell and the mitochondria [132]. Evidence of bacterial involvement in their synthesis and absorption is indisputable since their full metabolic pathways have

been elucidated [133–137]. In immune homeostasis, though both vitamins are required for hematopoiesis, the role of VB9 is better understood. Lower titers of VB12 seem to correlate with higher inflammation levels in critically ill patients [138], and were associated with higher mortality in hospitalized patients [139], but the vitamin's direct involvement remains unclear. VB9 titers, on the other hand, are strongly correlated with leukocyte counts [140]. VB9 deficiency induces DNA damage in lymphocyte precursors, similarly to those observed in radiation-induced injuries [141]. In allergic children, excessive levels of VB9 are also proportional to allergic symptoms, and inversely proportionate to circulating regulatory T lymphocytes levels [142]. Folate-associated receptors are found on mature immune cells, e.g., naive T lymphocytes, and might be involved in their activation or regulation [143]. Similar receptors on the surface of macrophages are overexpressed under certain conditions, such as hyperlipidemia, and lead to activation of macrophages in a proinflammatory profile, promoting, for example, atherosclerosis [144]. These receptors are targets for potential antiinflammatory drugs, notably for the control of chronic inflammatory states [145] and chronic IBD [146].

1.1.5. Amino Acids (AA) and AA-Derived Metabolites

Tryptophan

Tryptophan (Trp) is an essential amino acid mainly supplied by the diet. The majority of Trp is absorbed in the small intestine. A small portion can reach the colon, where it can be used by commensal bacteria. In humans, three Trp pathways are generally described: The kynurenine pathway, the indole pathway, and the serotonin pathway. Serotonin (also known as hydroxytryptamine or 5-HT) can modulate the immune response, and hence, potentially influence intestinal inflammation [147]. It has been demonstrated that GF mice increased plasma serotonin concentrations, which can be normalized following colonization of the mice immediately post-weaning [148]. Several of the 5-HT receptors have been associated with immune cells, such as lymphocytes, monocytes, macrophages, and DCs, which indicates that 5-HT plays an immune-modulatory role. Tryptamine concentrations increase nearly 200 fold in feces following colonization of GF mice with human gut microbiota, suggesting that bacterial metabolism of Trp generates luminal tryptamine [149]. The enzyme tryptophan decarboxylase (TDC1) is responsible for converting Trp to tryptamine, which is converted to serotonin by tryptamine 5-hydroxylase. The genes encoding the homologs of this TDC1 were found in at least 10% of the representative human gut microbiota [150]. Two comprehensive reviews have already discussed the link between the gut microbiota regulation of Trp and its impact on health and disease [151,152]. In addition to tryptamine, other metabolites, like indole derivatives or skatoles, are derived from the catabolism of Trp by the intestinal microbiota. Those are described in the review [153]. They have been intensively studied for their role in immunity, mainly through the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). In addition to this activity, indole is now studied for its ability to influence the gene transcription in some immune cell subsets and epithelial cells. Indeed, Microbiota-derived AhR ligands play a critical role in gut homeostasis; for instance, they have been associated with the increase of *Il22* transcript in type 3 innate lymphoid cells or ILC3 [154], and subsequent mucosal integrity. Trp-derived indoles also activate the pregnane X receptor (PXR) to support the barrier function in colitis mouse models [155]. One example is indole 3-propionic acid (IPA) produced by *Clostridium sporogenes*. This metabolite is absent in GF mice. The ability of *C. sporogenes* to produce IPA from Trp was recently described and is limited to a small group of organisms sharing the proper metabolic pathway [156]. GF-mice colonization with an IPA-producing strain like *C. sporogenes* restores the IPA serum level [13]. It was shown to activate the AhR and the PXR pathways leading to the reduction of the symptoms in a mice-dextran sodium sulfate (DSS) model of colitis [157,158]. Thus, IPA might be an interesting candidate for the treatment of UC. Other indoles, such as Indole Acrylic Acid (IA) [159] and Indole-3-aldehyde [154], are described in the literature for their effects on immune cells (Figure 3). Microbial metabolism of Trp resulting in indole derivatives, such as indole acetic acid and IPA, has been recently

investigated in several studies for their contributions to host physiology. In the future, Trp-derived metabolites should be considered as a promising strategy that can be used to treat human diseases [160].

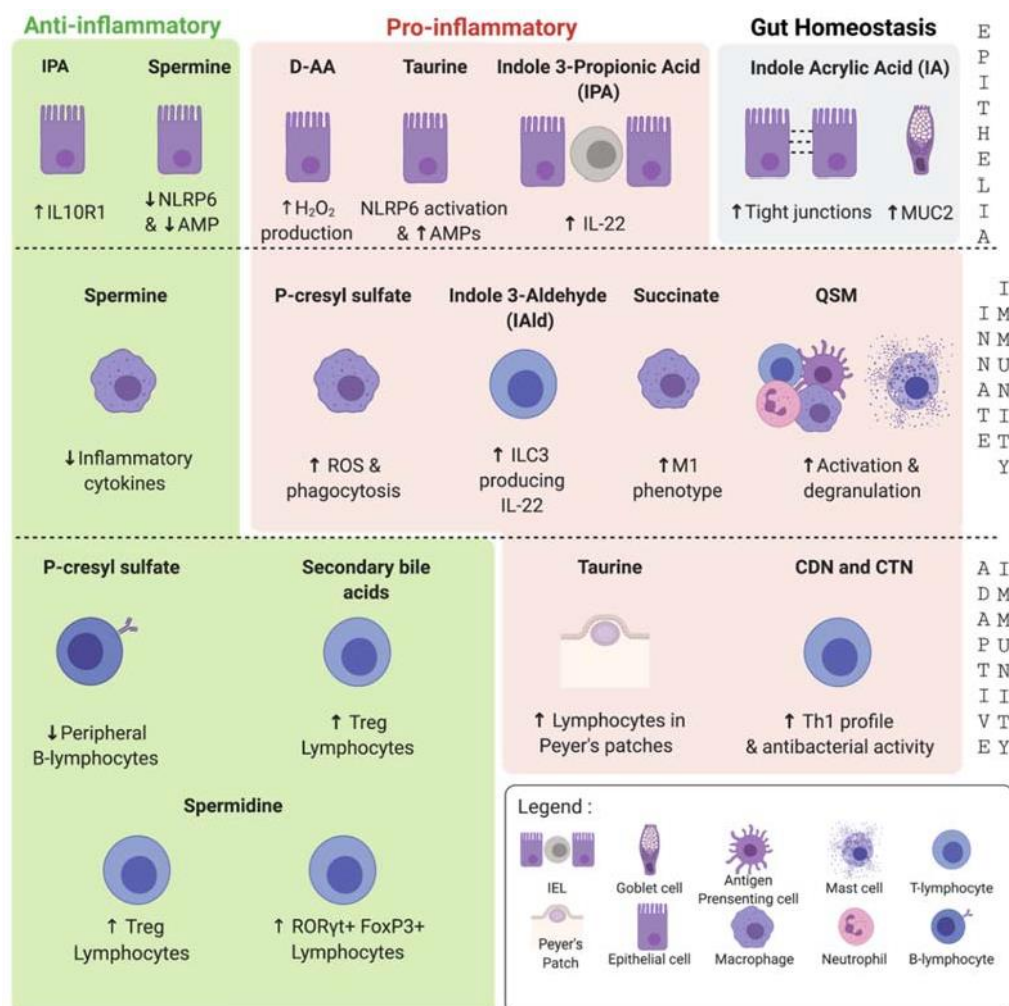


Figure 3. Summary of the immunomodulatory properties of the main described soluble metabolites on epithelial cells, as well as on innate and adaptive immune cells. D-AA, Stereoisomer D-amino acids; QSM, Quorum Sensing Molecules; CDN, Cyclic-DiNucleotides; CTN, Cyclic TriNucleotides.

Taurine

Taurine is a sulfur-containing amino acid that can be sourced from the diet or synthesized by the pancreas via the cysteine sulfinic acid pathway. Taurine is not per se a metabolite produced by bacteria. However, as described below, taurine reaches the colon in a conjugated form with bile acids (Bas). Its release in the colon depends directly on microbiota activity that can result in taurine deconjugation via bile salt hydrolase (BSH) activity. Thus, it can be considered as an indirect product of the colonic microbes. Taurine is known to be involved in many physiological events, such as osmoregulation, membrane stabilization, calcium mobilization, neurotransmission, reproduction, and detoxification [161–163], along with providing antiinflammatory effects and protection to cells from cytotoxic effects of inflammation. During Bas synthesis, glycine is more often used than taurine (ratio of 3:1) [164]. However, this ratio is subject to variation since the availability of taurine is diet-dependent (a western diet will favorize a taurine conjugation when vegetarians are using glycine [165,166]). In the Dexamethasone-induced immunosuppressive mice model, taurine was involved in the increase of lymphocytes in Peyer's patches, a well-known lymphoid follicle in the intestine classified as a gut-associated lymphoid tissue [167]. Similarly,

changes in the microbiota were observed after treating the mice with taurine. These groups showed a modification of the pattern, suggesting that some beneficial bacteria, such as *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae*, groups were significantly re-increased after treatment with taurine. The role of taurine on gut epithelial cells was also presented by Levy et al. and reported as an activator of the NLRP6 inflammasome leading to the activation of IL-18 and the production of antimicrobial peptides (AMPs) [168].

p-Cresol and Its Derivatives

p-Cresol is a methyl phenol produced by colonic fermentation of tyrosine and phenylalanine. After its production, most of the p-cresol (approximately 80%) in the intestinal wall is conjugated by the intestinal flora into p-cresyl sulfate (pCS) or p-cresyl glucuronidate. The association between the microbiota and p-cresol or its derivatives has been proven, for example, in GF-mice models, in which p-cresol or its derivatives were not found in the blood [13]. In humans, pCS is considered a uremic solute, and patients with chronic kidney failure display high blood pCS levels. However, among these patients, those who are also colonectomized normal display levels of pCS, demonstrating the colonic origin of pCS synthesis [169]. Culture-based tests have identified several intestinal bacteria as producers of p-cresol, such as those belonging to the *Coriobacteriaceae* and *Clostridium clusters* XI and XIVa [170]. A comprehensive overview of bacterial species able to produce phenolic compounds has been reviewed elsewhere [171]. Derivatives of p-cresol are considered as uremic toxins, involved in uremic syndromes developed during renal failure progression. The immunomodulatory effect of p-cresol and derivatives has been highlighted in chronic kidney disease (CKD) patients that are highly susceptible to infectious diseases [172]. The most studied p-cresol derivative is pCS, for its role on both innate and adaptive immunity. In an in vitro study, it was found to induce ROS production and phagocytosis at lower concentrations, while at higher concentrations, it was shown to interfere with antigen processing in human monocyte-derived macrophages [173]. Moreover, in a mouse model of adenine-induced renal dysfunction, pCS was found to be involved in immune dysfunction in CKD. It decreased peripheral B lymphocytes number by inhibiting the proliferation of CD43+ B-cell progenitor [174]. The role of pCS on Th1-type immune responses has been studied through a tyrosine-enriched diet mouse model. pCS was negatively correlated with the percentage of IFN- γ -producing Th1 cells during a 2, 4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity. In vitro assays on splenocytes exposed to a variable concentration of pCS suggested that intestinal-derived pCS suppresses the percentage of IFN- γ -producing Th1 cells and favors a Th2 response [175]. Finally, while the role of p-cresol derivatives has been increasingly characterized, the exact effect of p-cresol itself is still controversial [176]. Even if CKD is a good study model, it may be interesting to understand if pCS can influence the immune system in a healthy state, as p-cresol derivatives are constantly eliminated in urine through tubular secretion.

Histidine and Derivatives

Gut bacteria can convert amino acids, such as L-histidine, into biogenic amines (i.e., molecules containing one or more amino groups), such as histamine, by the action of histamine decarboxylase (HDC) [177]. Numerous immune cells produce histamine, mainly basophilic cells, and mast cells, and to a lesser extent, monocytes, DC, and lymphocytes [178]. Histamine production by basophils and mast cells, is modulated by cytokines, such as IL-3, IL-12, IL-18, TNF- α [179]. Histamine is mainly produced within the caecum, and found at lower levels in the wall of the small intestine in GF mice, compared to conventional mice [180]. Histamine, in addition to its role as a neuromediator and regulation of gastric acidity, is mainly described as a cytokine and an inflammatory mediator in acute inflammation and hypersensitivity. Recently, it has been shown that histamine produced by microbiota-associated bacteria impacts both intestinal epithelial cells and immune cells. In humans, Barcik et al. have performed a PCR analysis of bacterial HDC expression on fecal samples from 74 healthy donors, and identified *E. coli*, *Lactobacillus vaginalis*, and *Mor-*

ganella morganii as histamine-secreting bacteria. Interestingly, they also collected samples from 74 asthma patients, highlighting an increased bacterial HDC copy number compared to healthy donors. Furthermore, *Morganella morganii* relative abundance was correlated with disease severity, suggesting a possible involvement in asthma pathogenesis [181]. Histamine action is mediated by four types of receptors noted H1R to H4R, and leads to different effects, depending on the receptor subtype, its expression level, as well as the targeted cell. DCs express H1R, H2R, and H4R, receptor subtype. H1R engagement is involved in immediate hypersensitivity reaction, inducing vasodilatation, and promoting Th1 responses, while H2R activation leads to an inhibition of Th1 and Th2 responses and promotes Treg by increasing the production of IL-10 [182–184]. On adaptive immunity, in the same way, H1R promotes IFN- γ , the production, and the proliferation of Th1 cells, while H2R inhibits Th2 response by blocking the synthesis of IL-4 and IL-13 [178,185]. Thus, histamine affects the balance between Th1 and Th2 responses [178]. Levy et al. analyzed the immunomodulatory effects of some microbiota-associated metabolites and showed that histamine intake in drinking water led to a strong reduction of IL-18 proinflammatory cytokine production by inhibiting NLRP6 inflammasome assembly [168]. Of note, the therapeutic potential of a bioengineered histamine-overexpressing bacteria has also been investigated in an in vivo asthma model. When orally administrated, it led to a decrease of Th2 cytokines secretion by lung-derived cells, as well as proinflammatory cytokines and IL-10. These results suggest a global antiinflammatory effect, not only mediated by an inhibition of Th2 response. Thus, these data indicate that histamine-producing bacteria within the gut can potentially modulate systemic host immunity [186].

Polyamines

Among biogenic amines, polyamines (Pas) are organic compounds having more than two amino groups. They have been studied for their ability to modulate cellular functions, including gene regulation, stress resistance, cell proliferation, and differentiation [187]. Spermidine (N3) and spermine (N4), two putrescine-derivatives, are the major examples of Pas in human cells. These two metabolites can be found in food or directly produced by gut microbiota or any eukaryotic cells. While the ingested food is the major source of Pas in the small intestine and is a crucial source for the stability and the maintenance of gut tissues [188], the microbiota appears to be a major player in Pasproduction in the lower part of the intestine, i.e., the colon [189–191]. Pas are extensively studied for their interaction with epithelial cells and the immune system. Interestingly, Levy et al. reported that exogenous spermine significantly reduces the activation of NLRP6 inflammasome in IECs and subsequent release of IL-18, a cytokine that promotes the production of antimicrobial peptides (AMPs), an important element involved in gut microbiota modulation [168]. Spermine also exerts antiinflammatory effects directly on immune cells by inhibiting LPS-induced expression of proinflammatory cytokines, including IL-6, TNF- α , IL-1, MIP-1 α , MIP-1 β , by monocytes and macrophages [192,193]. This was confirmed in an in vivo sepsis mouse model where a systemic antiinflammatory effect was observed [194]. In addition to spermine, spermidine is also of interest for its effect in age-associated diseases [195–197], cardioprotection [198], tumor suppression, immune modulation, neuroprotection, metabolic syndromes, and stem cell function. All of these aspects have been extensively reviewed elsewhere [199]. Recently, spermidine was shown to play a major role in regulating T-cell differentiation and function. Spermidine exposition potentiates the in vitro Foxp3 + T-cell differentiation from both naïve and Th17 CD4+T-cells, in an autophagy-dependent manner [200], and dampens the IFN- γ -mediated monocyte response [201]. Moreover, the proTreg effect of spermidine has been confirmed in an in vivo colitis mouse model [200]. A considerable amount of studies suggested that Pas have real health benefits, making them potential therapeutic candidates [202,203].

D-Amino Acids

While mammalian cells can produce only two D-amino acids (D-AA), namely, D-serine and D-aspartate [204], pathogenic and commensal bacteria can produce several D-amino acids, which play an essential role in multiple biological processes [205]. Sasabe et al. reported that the mouse intestine is rich in free D-AA produced by gut microbiota [206]. They have found the D-amino acid oxidase (DAO), which is associated with D-AA, expressed in the villous epithelium of the small intestine. The oxidative deamination of the intestinal D-AA by DAO results in the generation of hydrogen peroxide, H_2O_2 , a strong oxidizing agent with antimicrobial activity, and leads to the modification of the human microbiota, protecting the mucosal surface of the small intestine against pathogens. Thus, they proposed bacterial D-AA acids and DAO as new examples of inter-kingdom communication. Beyond bacterial communication, D-amino acids display antimicrobial properties, such as ROS production, and bacteriostatic activity. They can regulate neutrophil chemotaxis and modulate immune tolerance. These properties have been comprehensively reviewed elsewhere [207].

Gamma-Aminobutyric Acid

The gut microbiota has a critical role in the production of gamma-aminobutyric acid (GABA). It is mainly produced through a one-step reaction from glutamate, catalyzed by glutamic acid decarboxylase [208]. It can also be produced by some microorganisms from putrescine [209] (see section polyamines). GABA production was described for several *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains [210], and it was reported that the introduction of a GABA-producing *Bifidobacterium* strain was sufficient to modulate GABA levels in the gut [211]. Among them, *Lact. Brevis* and *Bif. Dentium* were those producing the highest amounts of GABA [210]. GABA produced by *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 in the gut has been shown to have effects on the brain (the microbiota-gut-brain axis), and, in particular, resulting in a reduction of stress-induced corticosterone, and in depression- and anxiety-related behavior. In the context of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) infection, ETEC induces dysbiosis, increasing the GABA-producing *Lactobacillus lactis subsp. lactis*. The increased content of GABA in the jejunum of mice promotes intestinal IL-17 expression through a GABA-mTORC1 signaling pathway [212]. The effects of GABA on intestinal homeostasis have been described through its action on enterocytes. Firstly, it has been described as a selective stimulator of mucin-1 expression in epithelial cells [213]. Then, exposure of GABA to epithelial cells resulted in a decrease in IL-1 β -mediated inflammation and an increase in tight junctions and transforming growth factor beta (TGF- β) expression, thus providing a protective effect against the disruption of the intestinal barrier [214].

Quorum Sensing Molecules

Quorum sensing molecules (QSMs) consist of signaling molecules, sensing molecules, and downstream regulatory proteins produced and used by prokaryotes to monitor population density and assist a number of biological functions, such as biofilm formation and production of virulence factors. The gut microbiota has shown to have a very stable structure despite challenges in the gut, such as stomach acid and intestinal bile; its stability depends on QSMs [215]. Generally, in Gram-Negative bacteria, quorum sensing (QS) is composed of two components: A small soluble signaling molecule (predominantly N-acyl homoserine lactone (AHL) molecules) and a transcriptional regulatory protein (R protein). In gram-positive bacteria, QS systems are generally composed of three components, a signal peptide and a two-component regulatory system (TCS) itself composed of a membrane-bound histidine kinase (HK) sensor and an intracellular response regulator (RR) [216,217]. The main QSMs are AHLs, diketopiperazines (DKPs), 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs), diffusible signal factors (DSFs), autoinducer-2 (AI-2). QSMs are products of nutrients utilization, and many of them are synthesized from metabolites present in the environment. For instance, AHLs and AI-2 are both produced from S-adenosylmethionine, which is part of the methionine metabolism. AHLs are characterized by carbon acyl chains, some of which are derived from intermediate molecules of the fatty acid biosynthesis in the

host [216]. Surprisingly, some organisms use more than one QS signaling system, which means that QS is not only involved in intra-species communication, but also involved in inter-species communications. It is the case of AI-2, which is used both by Gram-positive and Gram-negative bacteria, and which is the only major type of QSM known to promote inter-species bacterial communication across distantly related bacterial species [218]. AI-2 has been shown to influence the composition of antibiotic-treated microbiota and modulate the abundance of certain phyla [219]. QSMs are also detected by immune cells and regulate the activity of both innate and adaptive immunity. For instance, bacterial autoinducers (Ais) elicit proinflammatory effects and modulate the activities of gut-associated T lymphocytes, macrophages, DCs, and neutrophils [220]. Moreover, Mast Cell activation through the mast-cell-specific GPCR, MRGPRX2, which are Gram-positive QSMs receptors [221] leads to degranulation and release of ROS, TNF- α , and Prostaglandin D2, thereby triggering a local inflammatory response. In 2019, the association between gut microbiota-derived AI-2 and the progression of colorectal cancer (CRC) has been highlighted [222]. This association was mediated by tumor-associated immune cells, such as macrophages. AI-2 was proposed as a novel biomarker for human CRC as its concentration was higher in colorectal tissue and stool of CRC groups compared with normal colonic mucosa and colorectal adenoma. Moreover, AI-2 levels increased depending on CRC staging in both tumor tissues and stool samples. A positive correlation was also found between AI-2 and Tumor necrosis factor ligand superfamily member 9 (TNFSF9), a costimulator of T-cell proliferation belonging to the TNF receptor family. This association was confirmed experimentally through the stimulation of macrophages with AI-2 extracts from *F. nucleatum* that showed a significant increase in TNFSF9 expression, thus confirming the link between microbial QS, inflammation, and CRC.

1.1.6. Catecholamines

Catecholamines (Cas), which include epinephrine (E, also known as adrenaline), norepinephrine (NE, also called noradrenaline), and dopamine, are a class of organic compounds characterized by a catechol structure, i.e., a benzene ring bearing two adjacent hydroxyl groups, and a side-chain amine, which contributes to receptor specificity [223]. Cas synthesis starts with dietary L-dopa as substrate, which is then enzymatically converted into dopamine, NE, and finally, E. Cas, especially NE and dopamine, are abundantly present within the human gastrointestinal tract [224]; in particular, approximately half of the NE amount in the mammalian body is produced within the pre-vertebral ganglia innervating the gut mucosa, while dopamine is synthesized in non-sympathetic enteric neurons within the intestinal wall [225,226]. It is unlikely instead to normally find E in the gut at a significant level, since the enzymes required for its conversion from NE are not expressed in the intestinal mucosa [227]. In addition to this, there is increasing evidence that the intestinal lumen Cas levels are gut microbiota-dependent [228]. While data on the magnitude of the microbial contribution to Cas levels in the gut are still scarce, because the normal NE and dopamine luminal concentrations are difficult to determine, it is instead clear that the presence of bacterially derived NE and dopamine contributes to make the gut a Cas-rich environment, together with dietary intake and enteric nervous system sources [228]. Among others [229,230], Asano and coworkers demonstrated that the gut microbiota plays a crucial role in producing biologically active free Cas in the gut lumen [231]. They showed that levels of NE and dopamine increased in specific pathogen-free mice with normal gut microbiota, when bacteria were present. The role of Cas as chemical neurotransmitters in the central and peripheral nervous systems, with a key position in regulating various physiological processes and functions, such as cognitive abilities and intestinal motility, is well-recognized [232]. In addition to this, Cas have shown to be potential inter-kingdom signaling molecules in the gut: In the 1990s, the pioneering work of Lyte et al. demonstrated that some pathogenic species could recognize exogenous Cas in vitro, leading to an increase in bacterial growth [233,234]. Later, Sperandio et al. showed for *E. coli* O157:H7 that the two-component regulator sensor kinase QseC is a receptor for

the host E and NE [235], supporting the observation that Cas could act as inter-kingdom signals [236]. In *Salmonella Typhimurium*, NE has been shown to trigger the expression of virulence-associated factors, including flagella-mediated motility and Type III protein secretion [237–239]. Signaling between host cells and microbes through Cas continues to attract interest among the scientific community, especially as it might play a key role in microbial dysbiosis and increase susceptibility to infection by altering the growth and virulence of human pathogens [228]. However, further investigation is needed to fully elucidate the luminal CA-related functions and their mechanisms. Finally, there are many studies indicating that Cas is also important immunomodulators during health and disease [240–243]. These functions were first observed in 1904, when pronounced leukocytosis was reported following subcutaneous administration of E in humans. It is now clear that lymphocytes and phagocytes are also Cas-producing cells [244], and there is evidence that Cas exert autoregulatory functions on immune cells by means of intracellular oxidative mechanisms [245]. To conclude, the consequences of lymphocyte/phagocyte-derived or exogenously administered Cas during shock and trauma are becoming increasingly clear [244]. During severe tissue trauma, the body experiences the destruction of noradrenergic nerve cell innervation, with a consequent release of NE into the systemic circulation. Lyte and Bailey reported that this led to increased proliferation of bacteria within the gastrointestinal system of an experimental murine model, probably contributing to the high incidence of systemic bacterial inflammation and sepsis following trauma hemorrhage [246]. Metabolites shared between different cell types and the gut microbiota, such as Cas, are particularly difficult to study. Further research is needed to understand the dynamics of Cas in the gut lumen and its impact on mucosal immunity. Mono-colonization with CA-producing microbial species and well-defined in vivo models will certainly help to decipher the role of each player.

1.1.7. Cyclic-Dinucleotides (CDNs) and Cyclic-Trinucleotides (CTNs)

CDNs are small nucleic acids produced by bacteria (and viruses) that act as essential secondary messengers that help them to coordinate a new response and shape their behavior after a change in their environment. For example, cyclic di-adenosine monophosphate (cyclic di-AMP) is involved in bacterial growth, biofilm formation, stress response, and antibiotic resistance [247]. When CDNs are sensed by immune cells, this results in proinflammatory responses. Depending on CDNs types, they can activate either STING (Stimulator of interferon genes) pathway, or the oxidoreductase RECON (NF- κ B controlling reductase). CDNs with two purine bases (such as c-di-GMP, 3',3' cGAMP, and c-di-AMP) triggers STING-mediated NF- κ B activation and type-I interferon [248]. In addition, the oxidoreductase RECON can specifically bind to cGAMP, and c-di-AMP, cUMP-AMP, resulting in the inhibition of its enzymatic activity and promoting a proinflammatory antibacterial state [249]. The RECON specificity is not limited to purine bases. It can also sense cyclic-trinucleotides (CTNs), such as cAMP-AMP-GMP produced by bacteria. Some of these CTNs are only recognized by the RECON sensor, but not by STING, leading to the inhibition of the NF- κ B responses [250]. In a pathological context where intracellular bacteria are involved, the ability of these bacteria to increase the diversity of their CDNs/CTNs can be considered as an evolutionary adaptation mechanism to evade host innate immunity and metabolic pathways. This area of research is still emerging, and we are certainly at the beginning of a concept.

1.1.8. Inosine

Inosine is a nucleoside formed from ribofuranose and hypoxanthine. Recently, it was shown that inosine produced by *Bifidobacterium pseudolongum* is able to change the immune response after an immune checkpoint blockade (ICB) therapy [251]. In their work, Mager et al. studied the difference in microbiota between CRC-positive mice challenged with conventional immunotherapy versus CRC-positive mice with no treatment. Seven bacterial species were found to be specific to ICB-treated tumors. A mono-colonization assay with

five of the seven species in a heterotopic model of CRC showed that only *B. pseudolongum* had the most important effect on immunotherapy, and this effect was mediated by inosine, which is found in high amounts in the sera of mice mono-colonized by this bacteria. Inosine can activate the adenosine 2A receptor in immune T-cells, and drive the Th1 differentiation of costimulated T lymphocytes.

1.1.9. Secondary Bile Acids

Bile acids are hydroxylated steroids involved in digestion and lipids absorption; they are considered hormones. Currently, it is known that primary bile acids, such as cholic acid and chenodeoxycholic acid, are synthesized in the liver and secreted in the intestine in a conjugated form with glycine or taurine. 95% of them are finally reabsorbed in the ileum and recycled by the liver; this cycle is known as enterohepatic circulation. The remaining 5% activates the FXR in the liver and intestine tissues. This leads to the repression of both the CYP7A1 gene, encoding for a rate-limiting enzyme in the classic bile acid synthesis pathway, and the CYP8B1 gene, required for cholic acid synthesis [252]. The microbiota interacts with the metabolism of bile acids at different stages. First, primary bile acids are deconjugated by bacterial communities via BSH. Then, they can also be transformed by the microbiota to produce more than 20 secondary bile acids (e.g., deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid (LCA)). Secondary bile acids can act as soluble mediators signaling through bile acid receptors (BARs) expressed by many types of cells, such as epithelial cells and some immune cell subsets. BARs encompassed a large family of GPCRs (e.g., GPBAR1) and nuclear (e.g., FXR) receptors. BARs can recognize both primary and secondary bile acids. A given BAR can recognize several bile acids that can either trigger an activating or an inhibitory signal, depending on the bile acid and BAR involved (Reviewed in [253]). They are viewed as a negative regulator of macrophages [254], DCs, and NKT [255] functions, supporting the idea that they contribute to the maintenance of a tolerogenic environment in the liver and intestine [256]. Recently, Song et al. demonstrated that deconjugated bile acids can promote the generation of colonic ROR γ t-expressing FoxP3+ Tregs through Vitamin D receptor (VDR) [257]. They demonstrated that genetic abolitions of bile acids metabolic pathways (required for secondary bile acids production) in individual gut symbiont (*Bacteroides thetaiotaomicron* and *Bacteroides fragilis*) decreases this T-cell population. This effect was cell-type- and tissue-type- specific, as no similar effects were observed either on colonic Th17, nor on Tregs and Th17 from the spleen, the mesenteric lymph node, or the small intestine, respectively. Importantly, these cells have been shown to display superior suppressive capacities in T-cell-mediated intestinal inflammation [258] than conventional FoxP3+ Tregs. Recently, Campbell et al. screened several secondary bile acids and identified the 3 β -hydroxydeoxycholic acid (isoDCA) as an immunosuppressive bile acid. IsoDCA alters DC-mediated T-cell stimulation, by decreasing DC costimulatory molecules expression and proinflammatory cytokine production that in turn promotes FoxP3+ Tregs generation [259].

1.2. Microbial Membrane Metabolites Affecting the Immune System

Microbes not only modulate host immunity through soluble metabolite secretion, but can also use membrane-bound metabolites. Unlike soluble metabolites, membrane-bound metabolites require more complex mechanisms to cross the epithelial gut barrier. It has been proposed that these strategies are based on outer membrane vesicle (OMV) formation or dead bacteria-derived membrane fragments. Presumably, followed by endocytosis or passive diffusion through epithelial cells, this class of metabolites then interacts with the gut-associated immune system. The entire mechanism needs to be further investigated to clearly understand how these metabolites move from the microbial membrane to immune cells (Figure 4).

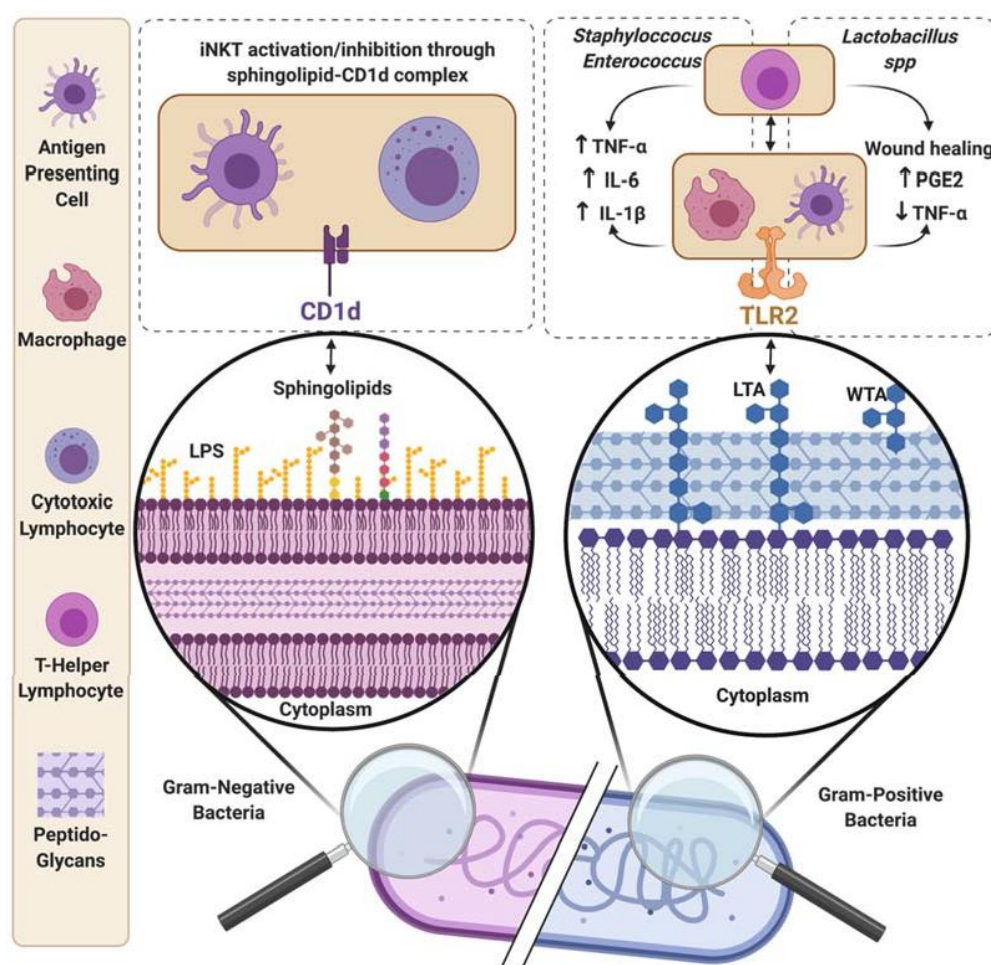


Figure 4. Summary of membrane-bound metabolites and their impact on immune cells. iNKT invariant Natural killer T, LTA, lipoteichoic acids; WTA, wall teichoic acids; PGE2, Prostaglandin E2.

1.2.1. Sphingolipids

Sphingolipids are a class of plasma-membrane-associated lipids containing a backbone of sphingosine. They are produced by both the host and specific bacteria. Host sphingolipids participate in a large and diverse range of physiologic cellular functions, as they are involved in specific signaling pathways, either acting themselves as signaling molecules or regulating downstream signaling molecule functions [260]. Within the gut, host-sphingolipid complexes, such as sphingomyelin (SM) and glycosphingolipids (GSLs), are essential components of epithelial cells, playing a role in lipid absorption, providing protection, and integrity of the mucosa. Host sphingolipids (notably ceramide-1-phosphate (C1P), sphingosine-1-phosphate (S1P), and ceramide (Cer)) have been described alternatively as anti or proinflammatory and act directly or indirectly as inflammatory mediators [261]. Along the intestine, the ratio of sphingolipids (pro/antiinflammatory) is tightly controlled, and dysregulation of this balanced ratio is observed in diseases, and notably in IBD. It has been shown that sphingolipid levels are significantly different between inflamed and non-inflamed intestinal tissues and may affect the immune gut ecosystem [262]. The production of SM-like sphingophospholipids is described in the gut from members of the Bacteroidetes phylum (e.g., Bacteroides ([263] and Prevotella [264]). Sphingolipids in sphingolipids-producer bacterial strains participate in stress resistance by preserving membrane integrity [265]. It is believed that Bacteroides-derived sphingolipids may cross the epithelium barrier and reach immune cells via OMV formation [266]. Sphingolipids are presented by antigen-presenting cells (APCs) through the CD1d receptor, an MHC class I-like receptor to CD1d-restricted innate-like lymphocytes called invariant Natural

killer T (iNKT). The best known CD1d-restricted iNKT ligand is aGalCer produced by *Sphingomonas* spp [267]. Recently, Kinjo et al. described that *Bacteroides fragilis* produced natural aGalCer analogs [267]. Early exposition to microbiota-derived sphingolipids, and notably *Bacteroides fragilis*-derived α -Galactosylceramide GSL-Bf717, prevents excessive colonic iNKT accumulation [268], and subsequent iNKT-related inflammatory disorders in adulthood [269]. The antiinflammatory properties of *Bacteroides*-derived sphingolipids were revealed by Brown et al., who showed that patients with Crohn's disease and UC had elevated levels of host-derived sphingolipids, while the abundance of *Bacteroides* was decreased [270]. To better understand the exact role of *Bacteroides*-derived sphingolipids, a GF mice mono-colonization experiment was performed with sphingolipid-deficient *B. thetaiotaomicron* strain and compared to the wild-type strain. The sphingolipid-deficient strain triggered intestinal inflammation, as revealed by histopathological inflammatory signatures, also characterized by an increase of IL-6 and MCP-1 proinflammatory cytokines within the colon [270]. Interestingly, Ultra-High Performance Liquid Chromatography (U-HPLC) coupled to an Exactive Plus orbitrap mass spectrometer lipidomics analysis revealed 35 unique sphingolipids derived from *Bacteroides*, highlighting the diversity of these molecules [270]. In conclusion, it is now clear that sphingolipids can modulate host immunity. However, depending on the producing organism, sphingolipids can differentially impact the immunity either toward inflammation or tolerance. Thus, microbial-derived sphingolipids have to be identified, isolated, and screened for their immune properties.

1.2.2. Lipoteichoic Acids

Lipoteichoic acids (LTA, from the Greek “teichos” meaning wall) are amphipathic polymeric molecules anchored onto the Gram-positive bacteria wall, which regulate several autolytic wall enzymes (muramidases) [271]. They are composed of a repeating unit of glycerophosphate or ribitolphosphate bound to a glycolipid anchor [272]. Another form of bacterial cell wall polymers are wall teichoic acids (WTA), which are instead covalently bound onto the peptidoglycan and that have been reviewed elsewhere [273]. For Gram-positive bacteria, TLR2 ligands are the primary host Toll-like receptors (TLRs) involved in the innate immune response [274]. Even if their nature is still controversial, several studies have suggested that LTA are their main activator [275–277]. It appears that LTA can play an immunostimulatory role, by activating in vitro the NF- κ B pathways in monocytes and macrophages, in a TLR2-dependent manner [276,278,279]. Other pattern recognition receptors (PRRs), such as C-lectins or Ig-receptors and CD14, have been shown to be involved in the immune response triggered by LTA during bacterial infections [280,281]. The activation of phagocytes promotes the production of cytokines, participating in appropriate antibacterial immune response in Gram-positive bacterial infection models [282–284]. However, some of the most compelling evidence on probiotics revolves around the LAB. The LTA of some LAB seems to exert a particular immuno-modulatory effect [285]. In murine models, dietary *Lactobacillus rhamnosus* allowed better healing from intestinal radiation, and in vitro studies confirmed the involvement of its specific LTA in the protective effect [286]. Other teams have shown a diminution in proinflammatory cytokine production from macrophages when exposed to the same LAB [287]. Animal experimentations with heat-killed *Lactobacillus paracasei* suggest that the exposition alone to the cell wall is enough to trigger the immunomodulatory effect, along with other beneficial effects of LTA, such as an increase in mucosal production via MUC2 production [288]. Grangette et al. demonstrated the possibility to enhance its antiinflammatory capacity by modifying the composition of an already beneficial type of LTA from *Lactobacillus plantarum*, therefore emphasizing the role of structural variations of LTA on the modulation of the host immune response [289]. The interactions between LTA and the immune system are not yet fully understood. Different levels of expression for TLR2 as a protective mechanism or a risk factor for inappropriate inflammation, as suggested by Melmed et al. [290], and other complex crosstalks should be furthermore examined to get a grasp on the intricate interactions that developed between bacterial LTA and human immune system during

our long coevolution. The structural diversity of LTA and their effects, combined with the complexity of microbiota composition, could participate in several reactions in the immune response, and thus, should be explored in appropriate samples whenever the question is relevant.

3. Metabolites Derived from Immune Cells Affecting the Microbiota

Although interactions between microbiota and host are bidirectional, most studies have mainly focused on the impact of bacteria strains and derived-metabolites onto immunity. To our knowledge, no study has yet described immune-derived “bona fide” metabolites impacting gut microbiota composition and functions. However, some studies highlighted that host immune activation triggers rapid microbiota modulation, at least at the transcriptional (and thus, functional) level. Moreover, it is now clear that the immune system acts on microbiota through several effector molecules, ranging from antimicrobial peptides to soluble Immunoglobulin A (sIgA). In order to emphasize the importance of this bidirectional dialogue, we briefly describe in this part the impact of the host immune system on gut microbiota modulation.

1.3. Gut Microbiota Modulation upon Acute and Chronic Host Immune System Activation

Most chronic inflammatory diseases are associated with dysbiotic gut microbiota. Many efforts have been made to determine whether dysbiosis was a cause or consequence of chronic inflammation. In IBD, for instance, patients display a dysbiotic profile [291–293]. Mice experiments revealed that in genetically identical hosts, the susceptibility to colitis relies on microbiota composition [294]. Recent studies have demonstrated that chronic inflammation also impacts microbiota at the meta-transcriptome level, in both IBD patients [295], and mouse colitis models [296,297]. Very recently, Becattini et al. assessed if gut microbiota also responds to acute (thus transient) host immune activation. In order to address this question, they used a simplified mouse model where GF mice were reconstituted with four anaerobic bacterial strains able to stably colonize the intestine [298]. Data indicates that following systemic immune activation via intraperitoneal flagellin administration (TLR5 activation), gut microbiota transcriptional and metabolic profiles rapidly change within 6 h, while the relative proportions of each strain remain stable. At 24h post immune activation, transcriptional profiles largely return to baseline. Flagellin administration triggers transcriptional modifications of hundreds of genes, upregulating genes involved in protein folding factors (chaperones), oxidative-species-scavenging molecules, and stress-response mediators, while downregulating genes mostly encoding metabolic enzymes, in particular, those involved in sugar catabolism and amino acid synthesis. Interestingly the use of another stimulus, e.g., anti-CD3 (T-cell activation), also triggers rapid and transient transcriptional modifications. Most of them are shared with flagellin conditions, but some differ, suggesting a gut microbiota adaption, depending on the stimulus and subsequent immune activation. Of note, when mice were reconstituted with three strains instead of four, the transcriptional profiles changes upon acute immune activation were different, suggesting that microbiota response to immunity also depends on its composition and on intra-microbes crosstalks. Altogether, those studies clearly indicate that immunity also deeply impact gut microbiota composition and function, depending on nature and lasting of the immune activation (i.e., acute versus chronic). The challenge is now to identify effector molecules involved in such dialogue, including immune system-derived metabolites.

1.4. The Antimicrobial Peptides

Antimicrobial peptides (AMPs) are key components of innate immunity against invading pathogens and represent one of the oldest innate effector systems. They act by disrupting bacterial cell membranes, modulating the immune response, and regulating inflammation. Being completely accurate, AMPs are not metabolites: They are small cationic molecules of 2–6 kDa that play an important role. The majority of intestinal AMPs

is produced by specialized secretory cells of the small intestinal mucosa, namely, the Paneth cells. The expression of AMPs is tightly regulated by the presence of microorganisms via different mechanisms, mainly implicating the activation of PRRs (TLRs and NLRs) in IECs [299]. Of note, IL-22 further promotes their production [300]. Among the various AMPs produced in the GI tract, defensins and cathelicidins constitute the two major classes. It has been shown that GF mice display a reduced AMPs expression [301], and that Paneth cell alteration can lead to dysbiosis [302], underlining the importance of microbiota and Paneth cells for optimal AMPs production and subsequent homeostatic control of intestinal-associated microorganisms, respectively. It is noteworthy that some AMPs can be further metabolized into bioactive metabolites that can shape the microbiota. Ehmann et al. showed that the Human Defensin 5 can be further degraded by proteases into peptides displaying antimicrobial properties. Among them, one peptide fragment promoted *Akkermansia* sp. growth without decreasing microbial diversity in mice [303]. Thus, AMPs are molecules belonging to innate immunity that can profoundly shape microbiota. Further investigations are required to better characterize the in vivo impact of AMPs and derived bioactive products, to design new microbiota modulation strategies.

1.5. Immune Cells-Derived Metabolites and Metabolite Mimicry

Upon activation, effector immune cells display specific metabolic states (immunometabolism). Indeed, Glycolysis or OXPHOS are preferentially initiated by Teff- and Treg-cells, respectively [304]. Thus, immune cells both consume and produce metabolites that can presumably modify the micro-environment milieu, and thus, influence immune cells and bacterial functions. For instance, Treg-cells can consume extracellular ATP via CD39/CD73 ecto-ATPase activity, leading to Teff-cell dysfunction [305]. Another example, is the production of retinoic acid (RA), a 300 Da metabolite produced by epithelial cells and dendritic cells from retinol. Retinol and RA are derivatives of vitamin A, an essential fat-soluble micronutrient. Their production in the gut relies on their nutritional intake. RA, the bioactive form of vitamin A derivate, is known to modulate the immune system. Indeed, it is involved in T helper cell differentiation [306–308], it is a modulator of the innate immune cells [309,310], and a modulator of epithelial tight junction proteins [311,312]. The bioavailability of epithelium-derived RA depends on the microbiota. Intestinal bacteria regulate the expression of the *Rdh7* gene of epithelial cells, coding for a retinol dehydrogenase which is involved in RA synthesis [313]. This example demonstrates that a metabolite produced by the intestinal epithelium following a stimulation of the microbiota can impact the immune response. Thus, the effect of RA on gut microbial communities relies on the indirect effect of RA regulating the immune system and mucosal barrier. It is thus conceivable that gut-associated immunity might trigger such metabolic-mediated effects on microbiota. Moreover, it has been shown that mammalian cells can produce molecules resembling bacterial metabolites. Ismail et al. described that colonic cells could produce an AutoInducer (AI)-2 mimic metabolite following tight-junctions disruption, or when submitted to a bacteria-derived secreted molecule [314]. AI-2 is proposed to promote interspecies bacterial communication [219], including in the mammalian gut. Interestingly, AI-2 mimic metabolite production by eukaryotic cells, and subsequent release within the gut lumen, modulates bacterial gene expression through AI-2 receptor signaling and activates quorum sensing system, including in pathogenic strains such as *Salmonella typhimurium* [314]. One can imagine that several metabolite mimics, able to modulate bacterial activity, might be produced by eukaryotic cells, including immune cells. It becomes now urgent to identify such immune-derived metabolites and metabolites mimics to better understand microbiota/host dialogue and design relevant strategies for manipulating these interactions.

4. Conclusions

This review provided a state-of-the-art description of the metabolites (produced from the microbiota, from the host, or from both) playing a major role in the crosstalk between gut microbiota and immune system.

Forty key metabolites are discussed, together with the modulations and immune pathways triggered in the gut. Evidence of the bidirectional impact of this crosstalk has been reviewed to contribute to a deeper understanding of the host-microorganism relationships, with a specific focus on the correlation between dysbiosis, microbial-based dysmetabolism, and pathogenesis.

To conclude, however extensive this review is, we should consider that 117 known microbial metabolites detected in fecal samples are present on the HMDB website. This suggests that we are at the dawn of the discovery of molecules that can have an impact on human health: Being part of this story is both exciting and challenging.

5. Challenges and Perspectives: How to Hear the Sound from Metabolite-Mediated Microbiota-Host Immunity Crosstalk

Research on metabolites in the gut has evolved extremely rapidly and enhanced our understandings of the crosstalk between host and microbiota in homeostasis and disease. Exploration of their richness and diversity requires special attention; in particular, the following five points should be carefully considered:

1. Improve the analytical tools to detect metabolites in the gut (depth of data acquisition, detection of chemicals of various nature, dynamic range of detection with a large order of magnitude of detection). Currently, ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) variants represent the best methods to address these challenges, and, in particular, to increase metabolite detection coverage [315]. The main limitations of LC-MS are the limited structural information and the complexity of obtaining absolute quantification, especially in non-targeted approaches.
2. Correctly assign the identity of a metabolite. The vast majority of information collected by metabolomics is “dark matter”, i.e., chemical signatures that remain uncharacterized. Therefore, new computational solutions to illuminating dark matter are needed [316]. Significant progress has been reported in exploring public data-rich libraries, finding chemicals and associated metadata, and applying molecular networking strategies to accelerate metabolite annotation, especially in the last few years [317–321]. Moreover, the development and maintenance of MS-based spectral databases, together with the increasing practice of sharing metabolomics data through these resources, play a key role in translating dark matter into biological knowledge [322]. Authentic chemical standards should be used to acquire both positive and negative mode MS/MS and MSⁿ spectra to supplement spectral databases such as HMDB [323], NIST20 [324], METLIN [325], MZcloud [326], MassBank [327], ReSpec [328], and GNPS [329].
3. Establish an extensive reference catalog of microbial genomes present in the human gut, as several big projects are already doing, such as the MetaHIT (METagenomics of the Human Intestinal Tract) project; the Human Microbiome Project, or others [2,3].
4. Integrate multi-omics datasets to recover microbe-metabolite relationships by using statistical analysis. Linear or neural network methods estimate the conditional probability that each molecule is present, given the presence of a specific microorganism [330–332]. The mmmvec tool (<https://github.com/biocore/mmmvec>; accessed on 15 January 2021), for instance, can reliably identify all of the experimentally determined *P. aeruginosa*-produced molecules of interest in the lung of cystic fibrosis patient chronically infected with *P. aeruginosa* [331].
5. Use experimental models relevant to the concept of molecular dialogue to unveil the respective role of microbiota and/or immune cells in the production of specific metabolites of interest. In a context where the microbial and host metabolite relation-

ships are not elucidated, this first work consists of a detailed experimental design, followed by a fundamental study on metabolites using specific pathological models (KO mice, mono-colonization of the microbiota with certain strains, synthetic biology strategy, GF and specific pathogen-free model, wilding mice [333], culturomic, metabolomic model with minimal microbiota, (reviewed in [334]) and in vitro models [335,336].

Non-targeted metabolomics approaches can stratify the metabolome and to reveal notable differences from a “pathological” metabolome to a “physiological” metabolome. The detection and identification of metabolotypes associated with the desired context, thus refining the reading of the metabolome and then encourage to associate its knowledge with previously observed cellular and molecular mechanisms or to set up experiments to define them.

The concept of exploiting metabolomics to perform activity screens to identify biologically active metabolites—which we term activity metabolomics—has been proposed recently by G. Siuzdak [337], and is already having a broad impact on biology. Finally, metabolomics investigation has shown to be a promising tool for the targeting and understanding of the microbiota-host crosstalk; however, this field is still in its infancy and more research and integrative tools are still needed.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo11060406/s1>, Table S1: Summarizing table of Microbiota-derived metabolites that modulate host immunity in the gut.

Author Contributions: All the authors participated extensively to the work presented in this review. Conceptualization, C.C., G.M. and A.L.G. Writing—original draft preparation, C.P., F.F., C.C., G.M. and A.L.G.; writing—review and editing, B.T., D.H., S.T., A.-R.T., C.P., F.F., C.C., G.M. and A.L.G.; visualization, C.P., G.M., C.C. and A.L.G.; supervision and administration, D.H. and A.L.G.; funding acquisition, D.H., A.L.G. and B.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: D.H. is supported by GEFLUC Dauphiné-Savoie, Ligue contre le Cancer Comité Isère, Université Grenoble Alpes IDEX Initiatives de Recherche Stratégiques. A.L.G. and B.T. were supported by “Vaincre la mucoviscidose” (VLM) and “Association Grégory Lemarchal” (AGL) (Grant number RF20180502189 and RF20190502416/1/1/68), ANR-15-IDEX-02, SATT Linksium and Fondation Université Grenoble Alpes.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cavalier-Smith, T. *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis*; The MIT Press: Cambridge, MA, USA, 1992; Volume 7, ISBN 0262519909.
2. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59–65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Huttenhower, C.; Gevers, D.; Knight, R.; Abubucker, S.; Badger, J.H.; Chinwalla, A.T.; Creasy, H.H.; Earl, A.M.; Fitzgerald, M.G.; Fulton, R.S.; et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **2012**, *486*, 207–214. [\[CrossRef\]](#)
4. Shi, Y.; Tyson, G.W.; Delong, E.F. Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the oceans water column. *Nature* **2009**, *459*, 266–269. [\[CrossRef\]](#)
5. Maron, P.A.; Ranjard, L.; Mougél, C.; Lemanceau, P. Metaproteomics: A new approach for studying functional microbial ecology. *Microb. Ecol.* **2007**, *53*, 486–493. [\[CrossRef\]](#)
6. Francino, M.P. Early development of the gut microbiota and immune health. *Pathogens* **2014**, *3*, 769–790. [\[CrossRef\]](#)
7. Hooper, L.V.; Littman, D.R.; Macpherson, A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* **2012**, *336*, 1268–1273. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Belkaid, Y.; Hand, T.W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* **2014**, *157*, 121–141. [\[CrossRef\]](#)
9. Zheng, D.; Liwinski, T.; Elinav, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res.* **2020**, *30*, 492–506. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Dorrestein, P.C.; Mazmanian, S.K.; Knight, R. Finding the Missing Links among Metabolites, Microbes, and the Host. *Immunity* **2014**, *40*, 824–832. [\[CrossRef\]](#)

11. Matsumoto, M.; Kibe, R.; Ooga, T.; Aiba, Y.; Kurihara, S.; Sawaki, E.; Koga, Y.; Benno, Y. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wikoff, W.R.; Anfora, A.T.; Liu, J.; Schultz, P.G.; Lesley, S.A.; Peters, E.C.; Siuzdak, G. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3698–3703. [[CrossRef](#)]
13. Macfarlane, S.; Macfarlane, G.T. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, *62*, 67–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Louis, P.; Flint, H.J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 29–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Cummings, J.H.; Pomare, E.W.; Branch, H.W.J.; Naylor, C.P.E.; MacFarlane, G.T. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* **1987**, *28*, 1221–1227. [[CrossRef](#)]
16. Sivaprakasam, S.; Bhutia, Y.D.; Yang, S.; Ganapathy, V. Short-chain fatty acid transporters: Role in colonic homeostasis. In *Comprehensive Physiology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2018; Volume 8, pp. 299–314.
17. Donohoe, D.R.; Garge, N.; Zhang, X.; Sun, W.; O’Connell, T.M.; Bunger, M.K.; Bultman, S.J. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab.* **2011**, *13*, 517–526. [[CrossRef](#)]
18. Schönfeld, P.; Wojtczak, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: The cellular perspective. *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 943–954. [[CrossRef](#)]
19. Dalile, B.; Van Oudenhove, L.; Vervliet, B.; Verbeke, K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 461–478. [[CrossRef](#)]
20. Donohoe, D.R.; Collins, L.B.; Wali, A.; Bigler, R.; Sun, W.; Bultman, S.J. The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Mol. Cell* **2012**, *48*, 612–626. [[CrossRef](#)]
21. Gerhauser, C. Impact of dietary gut microbial metabolites on the epigenome. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2018**, *373*, 20170359. [[CrossRef](#)]
22. Brown, A.J.; Goldsworthy, S.M.; Barnes, A.A.; Eilert, M.M.; Tcheang, L.; Daniels, D.; Muir, A.I.; Wigglesworth, M.J.; Kinghorn, I.; Fraser, N.J.; et al. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11312–11319. [[CrossRef](#)]
23. Le Poul, E.; Loison, C.; Struyf, S.; Springael, J.Y.; Lannoy, V.; Decobecq, M.E.; Brezillon, S.; Dupriez, V.; Vassart, G.; Van Damme, J.; et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25481–25489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Thangaraju, M.; Cresci, G.A.; Liu, K.; Ananth, S.; Gnanaprakasam, J.P.; Browning, D.D.; Mellinger, J.D.; Smith, S.B.; Digby, G.J.; Lambert, N.A.; et al. GPFM 09A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 2826–2832. [[CrossRef](#)]
25. Corrêa-Oliveira, R.; Fachi, J.L.; Vieira, A.; Sato, F.T.; Vinolo, M.A.R. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin. Transl. Immunol.* **2016**, *5*, e73. [[CrossRef](#)]
26. Sina, C.; Gavrilova, O.; Förster, M.; Till, A.; Derer, S.; Hildebrand, F.; Raabe, B.; Chalaris, A.; Scheller, J.; Rehmann, A.; et al. G Protein-Coupled Receptor 43 Is Essential for Neutrophil Recruitment during Intestinal Inflammation. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 7514–7522. [[CrossRef](#)]
27. Kaiko, G.E.; Ryu, S.H.; Koues, O.I.; Collins, P.L.; Solnica-Krezel, L.; Pearce, E.J.; Pearce, E.L.; Oltz, E.M.; Stappenbeck, T.S. The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. *Cell* **2016**, *165*, 1708–1720. [[CrossRef](#)]
28. Kelly, C.J.; Zheng, L.; Campbell, E.L.; Saeedi, B.; Scholz, C.C.; Bayless, A.J.; Wilson, K.E.; Glover, L.E.; Kominsky, D.J.; Magnuson, A.; et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 662–671. [[CrossRef](#)]
29. Tedelind, S.; Westberg, F.; Kjerrulf, M.; Vidal, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 2826–2832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Arpaia, N.; Campbell, C.; Fan, X.; Dikiy, S.; Van Der Veeken, J.; Deroos, P.; Liu, H.; Cross, J.R.; Pfeffer, K.; Coffey, P.J.; et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **2013**, *504*, 451–455. [[CrossRef](#)]
31. Yang, W.; Yu, T.; Huang, X.; Bilotta, A.J.; Xu, L.; Lu, Y.; Sun, J.; Pan, F.; Zhou, J.; Zhang, W.; et al. Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Gurav, A.; Sivaprakasam, S.; Bhutia, Y.D.; Boettger, T.; Singh, N.; Ganapathy, V. Slc5a8, a Na⁺-coupled high-affinity transporter for short-chain fatty acids, is a conditional tumour suppressor in colon that protects against colitis and colon cancer under low-fibre dietary conditions. *Biochem. J.* **2015**, *469*, 267–278. [[CrossRef](#)]
33. Hui, W.; Yu, D.; Cao, Z.; Zhao, X. Butyrate inhibit collagen-induced arthritis via Treg/IL-10/Th17 axis. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *68*, 226–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Liu, L.; Li, L.; Min, J.; Wang, J.; Wu, H.; Zeng, Y.; Chen, S.; Chu, Z. Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell. Immunol.* **2012**, *277*, 66–73. [[CrossRef](#)]
35. Singh, N.; Thangaraju, M.; Prasad, P.D.; Martin, P.M.; Lambert, N.A.; Boettger, T.; Offermanns, S.; Ganapathy, V. Blockade of dendritic cell development by bacterial fermentation products butyrate and propionate through a transporter (Slc5a8)-dependent inhibition of histone deacetylases. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27601–27608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Singh, N.; Gurav, A.; Sivaprakasam, S.; Brady, E.; Padia, R.; Shi, H.; Thangaraju, M.; Prasad, P.D.; Manicassamy, S.; Munn, D.H.; et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* **2014**, *40*, 128–139. [\[CrossRef\]](#)
37. Schulthess, J.; Pandey, S.; Capitani, M.; Rue-Albrecht, K.C.; Arnold, I.; Franchini, F.; Chomka, A.; Illott, N.E.; Johnston, D.G.W.; Pires, E.; et al. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity* **2019**, *50*, 432–445.e7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Lewis, K.; Lutgendorff, F.; Phan, V.; Söderholm, J.D.; Sherman, P.M.; McKay, D.M. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflamm. Bowel Dis.* **2010**, *16*, 1138–1148. [\[CrossRef\]](#)
39. Venegas, D.P.; De La Fuente, M.K.; Landskron, G.; González, M.J.; Quera, R.; Dijkstra, G.; Harmsen, H.J.M.; Faber, K.N.; Hermoso, M.A. Short chain fatty acids (SCFAs) mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 277. [\[CrossRef\]](#)
40. Mirmonsef, P.; Zariffard, M.R.; Gilbert, D.; Makinde, H.; Landay, A.L.; Spear, G.T. Short-Chain Fatty Acids Induce Pro-Inflammatory Cytokine Production Alone and in Combination with Toll-Like Receptor Ligands. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2012**, *67*, 391–400. [\[CrossRef\]](#)
41. Macia, L.; Tan, J.; Vieira, A.T.; Leach, K.; Stanley, D.; Luong, S.; Maruya, M.; Ian McKenzie, C.; Hijikata, A.; Wong, C.; et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
42. Kim, M.H.; Kang, S.G.; Park, J.H.; Yanagisawa, M.; Kim, C.H. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology* **2013**, *145*, 396–406.e10. [\[CrossRef\]](#)
43. Park, J.; Kim, M.; Kang, S.G.; Jannasch, A.H.; Cooper, B.; Patterson, J.; Kim, C.H. Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR-S6K pathway. *Mucosal Immunol.* **2015**, *8*, 80–93. [\[CrossRef\]](#)
44. Belenguer, A.; Duncan, S.H.; Holtrop, G.; Anderson, S.E.; Lobley, G.E.; Flint, H.J. Impact of pH on lactate formation and utilization by human fecal microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 6526–6533. [\[CrossRef\]](#)
45. Belenguer, A.; Holtrop, G.; Duncan, S.H.; Anderson, S.E.; Calder, A.G.; Flint, H.J.; Lobley, G.E. Rates of production and utilization of lactate by microbial communities from the human colon. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *77*, 107–119. [\[CrossRef\]](#)
46. Iraporda, C.; Errea, A.; Romanin, D.E.; Cayet, D.; Pereyra, E.; Pignataro, O.; Sirard, J.C.; Garrote, G.L.; Abraham, A.G.; Rumbo, M. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology* **2015**, *220*, 1161–1169. [\[CrossRef\]](#)
47. Hove, H.; Nordgaard-Andersen, I.; Mortensen, P.B. Faecal DL-lactate concentration in 100 gastrointestinal patients. *Scand. J. Gastroenterol.* **1994**, *29*, 255–259. [\[CrossRef\]](#)
48. Vernia, P.; Caprilli, R.; Latella, G.; Barbetti, F.; Magliocca, F.M.; Cittadini, M. Fecal Lactate and Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* **1988**, *95*, 1564–1568. [\[CrossRef\]](#)
49. Wang, S.P.; Rubio, L.A.; Duncan, S.H.; Donachie, G.E.; Holtrop, G.; Lo, G.; Farquharson, F.M.; Wagner, J.; Parkhill, J.; Louis, P.; et al. Pivotal Roles for pH, Lactate, and Lactate-Utilizing Bacteria in the Stability of a Human Colonic Microbial Ecosystem. *mSystems* **2020**, *5*, 645–665. [\[CrossRef\]](#)
50. Krautkramer, K.A.; Fan, J.; Bäckhed, F. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 77–94. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Ranganathan, P.; Shanmugam, A.; Swafford, D.; Suryawanshi, A.; Bhattacharjee, P.; Hussein, M.S.; Koni, P.A.; Prasad, P.D.; Kurago, Z.B.; Thangaraju, M.; et al. GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental Colitis. *J. Immunol.* **2018**, *ji1700604*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Errea, A.; Cayet, D.; Marchetti, P.; Tang, C.; Kluz, J.; Offermanns, S.; Sirard, J.-C.; Rumbo, M. Lactate Inhibits the Pro-Inflammatory Response and Metabolic Reprogramming in Murine Macrophages in a GPR81-Independent Manner. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163694. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. SHAN, T.; CHEN, S.; CHEN, X.; WU, T.; YANG, Y.; LI, S.; MA, J.; ZHAO, J.; LIN, W.; LI, W.; et al. M2-TAM subsets altered by lactic acid promote T-cell apoptosis through the PD-L1/PD-1 pathway. *Oncol. Rep.* **2020**, *44*, 1885–1894. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Dietl, K.; Renner, K.; Dettmer, K.; Timischl, B.; Eberhart, K.; Dorn, C.; Hellerbrand, C.; Kastenberger, M.; Kunz-Schughart, L.A.; Oefner, P.J.; et al. Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 1200–1209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Haas, R.; Smith, J.; Rocher-Ros, V.; Nadkarni, S.; Montero-Melendez, T.; D'Acquisto, F.; Bland, E.J.; Bombardieri, M.; Pitzalis, C.; Perretti, M.; et al. Lactate regulates metabolic and proinflammatory circuits in control of T cell migration and effector functions. *PLoS Biol.* **2015**, *13*, e1002202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Angelin, A.; Gil-de-Gómez, L.; Dahiya, S.; Jiao, J.; Guo, L.; Levine, M.H.; Wang, Z.; Quinn, W.J.; Kopinski, P.K.; Wang, L.; et al. Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 1282–1293.e7. [\[CrossRef\]](#)
57. Upadhyay, D.; Singh, A.; Das, P.; Mehtab, J.; Dattagupta, S.; Ahuja, V.; Makharia, G.K.; Jagannathan, N.R.; Sharma, U. Abnormalities in metabolic pathways in celiac disease investigated by the metabolic profiling of small intestinal mucosa, blood plasma and urine by NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* **2020**, *33*, e4305. [\[CrossRef\]](#)

58. Faith, J.J.; Ahern, P.P.; Ridaura, V.K.; Cheng, J.; Gordon, J.I. Identifying gut microbe-host phenotype relationships using combinatorial communities in gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 220ra11. [\[CrossRef\]](#)
59. Meijer-Severs, G.J.; Van Santen, E. Short-chain fatty acids and succinate in feces of healthy human volunteers and their correlation with anaerobe cultural counts. *Scand. J. Gastroenterol.* **1987**, *22*, 672–676. [\[CrossRef\]](#)
60. Macias-Ceja, D.C.; Ortiz-Masiá, D.; Salvador, P.; Gisbert-Ferrándiz, L.; Hernández, C.; Hausmann, M.; Rogler, G.; Esplugues, J.V.; Hinojosa, J.; Alós, R.; et al. Succinate receptor mediates intestinal inflammation and fibrosis. *Mucosal Immunol.* **2019**, *12*, 178–187. [\[CrossRef\]](#)
61. Littlewood-Evans, A.; Sarret, S.; Apfel, V.; Loesle, P.; Dawson, J.; Zhang, J.; Muller, A.; Tigani, B.; Kneuer, R.; Patel, S.; et al. GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 1655–1662. [\[CrossRef\]](#)
62. Pålsson-McDermott, E.M.; O'Neill, L.A.J. Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. *Cell Res.* **2020**, *30*, 300–314. [\[CrossRef\]](#)
63. Rubic, T.; Lametschwandtner, G.; Jost, S.; Hinteregger, S.; Kund, J.; Carballido-Perrig, N.; Schwärzler, C.; Junt, T.; Voshol, H.; Meingassner, J.G.; et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1261–1269. [\[CrossRef\]](#)
64. Saraiva, A.L.; Veras, F.P.; Peres, R.S.; Talbot, J.; De Lima, K.A.; Luiz, J.P.; Carballido, J.M.; Cunha, T.M.; Cunha, F.Q.; Ryffel, B.; et al. Succinate receptor deficiency attenuates arthritis by reducing dendritic cell traffic and expansion of Th17 cells in the lymph nodes. *FASEB J.* **2018**, *32*, 6550–6558. [\[CrossRef\]](#)
65. Nadjisombati, M.S.; McGinty, J.W.; Lyons-Cohen, M.R.; Jaffe, J.B.; DiPeso, L.; Schneider, C.; Miller, C.N.; Pollack, J.L.; Nagana Gowda, G.A.; Fontana, M.F.; et al. Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. *Immunity* **2018**, *49*, 33–41.e7. [\[CrossRef\]](#)
66. Schneider, C.; O'Leary, C.E.; von Moltke, J.; Liang, H.E.; Ang, Q.Y.; Turnbaugh, P.J.; Radhakrishnan, S.; Pellizzon, M.; Ma, A.; Locksley, R.M. A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. *Cell* **2018**, *174*, 271–284.e14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Lei, W.; Ren, W.; Ohmoto, M.; Urban, J.F.; Matsumoto, I.; Margolskee, R.F.; Jiang, P. Activation of intestinal tuft cell-expressed *sucnr1* triggers type 2 immunity in the mouse small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 5552–5557. [\[CrossRef\]](#)
68. Jakobsdóttir, G.; Xu, J.; Molin, G.; Ahrné, S.; Nyman, M. High-fat diet reduces the formation of butyrate, but increases succinate, inflammation, liver fat and cholesterol in rats, while dietary fibre counteracts these effects. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80476. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Ooi, M.; Nishiumi, S.; Yoshie, T.; Shiomi, Y.; Kohashi, M.; Fukunaga, K.; Nakamura, S.; Matsumoto, T.; Hatano, N.; Shinohara, M.; et al. GC/MS-based profiling of amino acids and TCA cycle-related molecules in ulcerative colitis. *Inflamm. Res.* **2011**, *60*, 831–840. [\[CrossRef\]](#)
70. Connors, J.; Dawe, N.; Van Limbergen, J. The role of succinate in the regulation of intestinal inflammation. *Nutrients* **2019**, *11*, 25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Wolak, N.; Zawrotniak, M.; Gogol, M.; Kozik, A.; Rapala-Kozik, M. Vitamins B1, B2, B3 and B9—Occurrence, Biosynthesis Pathways and Functions in Human Nutrition. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2016**, *17*, 1075–1111. [\[CrossRef\]](#)
72. Magnúsdóttir, S.; Ravcheev, D.; De Crécy-Lagard, V.; Thiele, I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests cooperation among gut microbes. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Putnam, E.E.; Goodman, A.L. B vitamin acquisition by gut commensal bacteria. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008208. [\[CrossRef\]](#)
74. Rodionov, D.A.; Arzamasov, A.A.; Khoroshkin, M.S.; Iablokov, S.N.; Leyn, S.A.; Peterson, S.N.; Novichkov, P.S.; Osterman, A.L. Micronutrient requirements and sharing capabilities of the human gut microbiome. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1316. [\[CrossRef\]](#)
75. Radjabzadeh, D.; Boer, C.G.; Beth, S.A.; van der Wal, P.; Kieft-De Jong, J.C.; Jansen, M.A.E.; Konstantinov, S.R.; Peppelenbosch, M.P.; Hays, J.P.; Jaddoe, V.W.V.; et al. Diversity, compositional and functional differences between gut microbiota of children and adults. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.M.; et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **2011**, *473*, 174–180. [\[CrossRef\]](#)
77. Costea, P.I.; Hildebrand, F.; Manimozhiyan, A.; Bäckhed, F.; Blaser, M.J.; Bushman, F.D.; De Vos, W.M.; Ehrlich, S.D.; Fraser, C.M.; Hattori, M.; et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* **2017**, *3*, 8–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Yoshii, K.; Hosomi, K.; Sawane, K.; Kunisawa, J. Metabolism of dietary and microbial vitamin b family in the regulation of host immunity. *Front. Nutr.* **2019**, *6*, 48. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. Nabokina, S.M.; Said, H.M. A high-affinity and specific carrier-mediated mechanism for uptake of thiamine pyrophosphate by human colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2012**, *303*, G389–G395. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Frank, R.A.W.; Leeper, F.J.; Luisi, B.F. Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 892–905. [\[CrossRef\]](#)
81. Ashokkumar, B.; Kumar, J.S.; Hecht, G.A.; Said, H.M. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits intestinal vitamin B1 (thiamin) uptake: Studies with human-derived intestinal epithelial Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2009**, *297*, 825–833. [\[CrossRef\]](#)

82. Subramanya, S.B.; Subramanian, V.S.; Said, H.M. Chronic alcohol consumption and intestinal thiamin absorption: Effects on physiological and molecular parameters of the uptake process. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2010**, *299*, G23–G31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Seligmann, H.; Levi, R.; Konijn, A.M.; Prokocimer, M. Thiamine deficiency in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia: Apilot study. *Postgrad. Med. J.* **2001**, *77*, 582–585. [\[CrossRef\]](#)
84. Mürri, R.M.; Von Overbeck, J.; Furrer, J.; Ballmer, P.E. Thiamin deficiency in HIV-positive patients: Evaluation by erythrocyte transketolase activity and thiamin pyrophosphate effect. *Clin. Nutr.* **1999**, *18*, 375–378. [\[CrossRef\]](#)
85. Ottinger, C.A.; Honeyfield, D.C.; Densmore, C.L.; Iwanowicz, L.R. Impact of thiamine deficiency on T-cell dependent and T-cell independent antibody production in lake trout. *J. Aquat. Anim. Health* **2012**, *24*, 258–273. [\[CrossRef\]](#)
86. de Moreno de LeBlanc, A.; Levit, R.; de Giori, G.S.; LeBlanc, J.G. Vitamin Producing Lactic Acid Bacteria as Complementary Treatments for Intestinal Inflammation. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* **2018**, *17*, 50–56. [\[CrossRef\]](#)
87. Li, L.; Krause, L.; Somers, S. Associations between micronutrient intakes and gut microbiota in a group of adults with cystic fibrosis. *Clin. Nutr.* **2017**, *36*, 1097–1104. [\[CrossRef\]](#)
88. Ghashut, R.A.; McMillan, D.C.; Kinsella, J.; Talwar, D. Erythrocyte concentrations of B1, B2, B6 but not plasma C and E are reliable indicators of nutrition status in the presence of systemic inflammation. *Clin. Nutr. ESPEN* **2017**, *17*, 54–62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Dey, S.; Bishayi, B. Riboflavin along with antibiotics balances reactive oxygen species and inflammatory cytokines and controls Staphylococcus aureus infection by boosting murine macrophage function and regulates inflammation. *J. Inflamm.* **2016**, *13*, 1–21. [\[CrossRef\]](#)
90. Mazur-Bialy, A.I.; Pocheć, E. Riboflavin reduces pro-inflammatory activation of adipocyte-macrophage co-culture. Potential application of vitamin B2 enrichment for attenuation of insulin resistance and metabolic syndrome development. *Molecules* **2016**, *21*, 1724. [\[CrossRef\]](#)
91. Qureshi, A.A.; Tan, X.; Reis, J.C.; Badr, M.Z.; Papasian, C.J.; Morrison, D.C.; Qureshi, N. Suppression of nitric oxide induction and pro-inflammatory cytokines by novel proteasome inhibitors in various experimental models. *Lipids Health Dis.* **2011**, *10*, 1–25. [\[CrossRef\]](#)
92. Tastan, C.; Karhan, E.; Zhou, W.; Fleming, E.; Voigt, A.Y.; Yao, X.; Wang, L.; Horne, M.; Placek, L.; Kozhaya, L.; et al. Tuning of human MAIT cell activation by commensal bacteria species and MR1-dependent T-cell presentation. *Mucosal Immunol.* **2018**, *11*, 1591–1605. [\[CrossRef\]](#)
93. Kumar, V.; Ahmad, A. Role of MAIT cells in the immunopathogenesis of inflammatory diseases: New players in old game. *Int. Rev. Immunol.* **2018**, *37*, 90–110. [\[CrossRef\]](#)
94. Von Martels, J.Z.H.; Bourgonje, A.R.; Klaassen, M.A.Y.; Alkhalifah, H.A.A.; Sadaghian Sadabad, M.; Vich Vila, A.; Gacesa, R.; Gabriëls, R.Y.; Steinert, R.E.; Jansen, B.H.; et al. Riboflavin Supplementation in Patients with Crohn's Disease [the RISE-UP study]. *J. Crohn's Colitis* **2020**, *14*, 595–607. [\[CrossRef\]](#)
95. Mohedano, M.L.; Hernández-Recio, S.; Yépez, A.; Requena, T.; Martínez-Cuesta, M.C.; Peláez, C.; Russo, P.; LeBlanc, J.G.; Spano, G.; Aznar, R.; et al. Real-time detection of riboflavin production by Lactobacillus plantarum strains and tracking of their gastrointestinal survival and functionality in vitro and in vivo using mCherry labeling. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1748. [\[CrossRef\]](#)
96. Shats, I.; Williams, J.G.; Liu, J.; Makarov, M.V.; Wu, X.; Lih, F.B.; Deterding, L.J.; Lim, C.; Xu, X.; Randall, T.A.; et al. Bacteria Boost Mammalian Host NAD Metabolism by Engaging the Deamidated Biosynthesis Pathway. *Cell Metab.* **2020**, *31*, 564–579.e7. [\[CrossRef\]](#)
97. Cetina Biefer, H.R.; Vasudevan, A.; Elkhail, A. Aspects of tryptophan and nicotinamide adenine dinucleotide in immunity: A new twist in an old tale. *Int. J. Tryptophan Res.* **2017**, *10*, 117864691771349. [\[CrossRef\]](#)
98. Rajman, L.; Chwalek, K.; Sinclair, D.A. Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 529–547. [\[CrossRef\]](#)
99. Blacher, E.; Bashiardes, S.; Shapiro, H.; Rothschild, D.; Mor, U.; Dori-Bachash, M.; Kleimeyer, C.; Moresi, C.; Harnik, Y.; Zur, M.; et al. Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice. *Nature* **2019**, *572*, 474–480. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
100. Yamamoto, Y.; Nakanishi, Y.; Murakami, S.; Aw, W.; Tsukimi, T.; Nozu, R.; Ueno, M.; Hioki, K.; Nakahigashi, K.; Hirayama, A.; et al. A Metabolomic-Based Evaluation of the Role of Commensal Microbiota throughout the Gastrointestinal Tract in Mice. *Microorganisms* **2018**, *6*, 101. [\[CrossRef\]](#)
101. Montserrat- de la Paz, S.; Naranjo, M.C.; Lopez, S.; Abia, R.; Muriana, F.J.G.; Bermudez, B. Niacin and its metabolites as master regulators of macrophage activation. *J. Nutr. Biochem.* **2017**, *39*, 40–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Hong, G.; Zheng, D.; Zhang, L.; Ni, R.; Wang, G.; Fan, G.C.; Lu, Z.; Peng, T. Administration of nicotinamide riboside prevents oxidative stress and organ injury in sepsis. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *123*, 125–137. [\[CrossRef\]](#)
103. Ganji, S.H.; Kamanna, V.S.; Kashyap, M.L. Niacin decreases leukocyte myeloperoxidase: Mechanistic role of redox agents and Src/p38MAP kinase. *Atherosclerosis* **2014**, *235*, 554–561. [\[CrossRef\]](#)
104. Ferreira, R.G.; Matsui, T.C.; Godin, A.M.; Gomides, L.F.; Pereira-Silva, P.E.M.; Duarte, I.D.G.; Menezes, G.; Coelho, M.M.; Klein, A. Neutrophil recruitment is inhibited by nicotinamide in experimental pleurisy in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *685*, 198–204. [\[CrossRef\]](#)

105. Bhatt, B.; Zeng, P.; Zhu, H.; Sivaprakasam, S.; Li, S.; Xiao, H.; Dong, L.; Shiao, P.; Kolhe, R.; Patel, N.; et al. Gpr109a Limits Microbiota-Induced IL-23 Production To Constrain ILC3-Mediated Colonic Inflammation. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 2905–2914. [\[CrossRef\]](#)
106. Nitto, T.; Onodera, K. The linkage between coenzyme A metabolism and inflammation: Roles of pantetheinase. *J. Pharmacol. Sci.* **2013**, *123*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
107. He, W.; Hu, S.; Du, X.; Wen, Q.; Zhong, X.P.; Zhou, X.; Zhou, C.; Xiong, W.; Gao, Y.; Zhang, S.; et al. Vitamin B5 reduces bacterial growth via regulating innate immunity and adaptive immunity in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 365. [\[CrossRef\]](#)
108. Ghosal, A.; Lambrecht, N.; Subramanya, S.B.; Kapadia, R.; Said, H.M. Conditional knockout of the *Slc5a6* gene in mouse intestine impairs biotin absorption. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2013**, *304*, G64–G71. [\[CrossRef\]](#)
109. Sabui, S.; Kapadia, R.; Ghosal, A.; Schneider, M.; Lambrecht, N.W.G.; Said, H.M. Biotin and pantothenic acid oversupplementation to conditional *SLC5A6* KO mice prevents the development of intestinal mucosal abnormalities and growth defects. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2018**, *315*, C73–C79. [\[CrossRef\]](#)
110. Spady, M. Vitamin B6 Deficiency. *AJN, Am. J. Nurs.* **1960**, *60*, 83. [\[CrossRef\]](#)
111. Rosenberg, J.; Ischebeck, T.; Commichau, F.M. Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production. *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35*, 31–40. [\[CrossRef\]](#)
112. Rosenberg, J.; Yeak, K.Y.C.; Commichau, F.M. A two-step evolutionary process establishes a non-native vitamin B6 pathway in *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20*, 156–168. [\[CrossRef\]](#)
113. Nirmagustina, D.E.; Yang, Y.; Kumrungsee, T.; Yanaka, N.; Kato, N. Gender difference and dietary supplemental vitamin B6: Impact on colon luminal environment. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2018**, *64*, 116–128. [\[CrossRef\]](#)
114. Zheng, X.; Feng, L.; Jiang, W.D.; Wu, P.; Liu, Y.; Jiang, J.; Kuang, S.Y.; Tang, L.; Tang, W.N.; Zhang, Y.A.; et al. Dietary pyridoxine deficiency reduced growth performance and impaired intestinal immune function associated with TOR and NF- κ B signalling of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish. Immunol.* **2017**, *70*, 682–700. [\[CrossRef\]](#)
115. Roubenoff, R.; Roubenoff, R.A.; Selhub, J.; Nadeau, M.R.; Cannon, J.G.; Freeman, L.M.; Dinarello, C.A.; Rosenberg, I.H. Abnormal vitamin b6 status in rheumatoid cachexia association with spontaneous tumor necrosis factor α production and markers of inflammation. *Arthritis Rheum.* **1995**, *38*, 105–109. [\[CrossRef\]](#)
116. Chiang, E.P.I.; Selhub, J.; Bagley, P.J.; Dallal, G.; Roubenoff, R. Pyridoxine supplementation corrects vitamin B6 deficiency but does not improve inflammation in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2005**, *7*, R1404. [\[CrossRef\]](#)
117. Molina-López, J.; Florea, D.; Quintero-Oso, B.; de la Cruz, A.P.; Rodríguez-Elvira, M.; del Pozo, E.P. Pyridoxal-5^t-phosphate deficiency is associated with hyperhomocysteinemia regardless of antioxidant, thiamine, riboflavin, cobalamine, and folate status in critically ill patients. *Clin. Nutr.* **2016**, *35*, 706–712. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
118. Dusitanond, P.; Eikelboom, J.W.; Hankey, G.J.; Thom, J.; Gilmore, G.; Loh, K.; Yi, Q.; Klijn, C.J.M.; Langton, P.; Van Bockxmeer, F.M.; et al. Homocysteine-lowering treatment with folic acid, cobalamin, and pyridoxine does not reduce blood markers of inflammation, endothelial dysfunction, or hypercoagulability in patients with previous transient ischemic attack or stroke: A randomized substudy of the Vitatops. *Stroke* **2005**, *36*, 144–146. [\[CrossRef\]](#)
119. Selhub, J.; Byun, A.; Liu, Z.; Mason, J.B.; Bronson, R.T.; Crott, J.W. Dietary vitamin B6 intake modulates colonic inflammation in the IL10^{-/-} model of inflammatory bowel disease. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 2138–2143. [\[CrossRef\]](#)
120. Zhang, P.; Tsuchiya, K.; Kinoshita, T.; Kushiya, H.; Suidasari, S.; Hatakeyama, M.; Imura, H.; Kat, N.; Suda, T. Vitamin B6 Prevents IL-1 β Protein Production by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 24517–24527. [\[CrossRef\]](#)
121. Qian, B.; Shen, S.; Zhang, J.; Jing, P. Effects of Vitamin B6 Deficiency on the Composition and Functional Potential of T Cell Populations. *J. Immunol. Res.* **2017**, *2017*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
122. Kobayashi, C.; Kurohane, K.; Imai, Y. High dose dietary pyridoxine induces T-helper type 1 polarization and decreases contact hypersensitivity response to fluorescein isothiocyanate in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 532–538. [\[CrossRef\]](#)
123. Katunuma, N.; Matsui, A.; Endo, K.; Hanba, J.; Sato, A.; Nakano, M.; Yuto, Y.; Tada, Y.; Asao, T.; Himeno, K.; et al. Inhibition of intracellular cathepsin activities and suppression of immune responses mediated by helper T lymphocyte type-2 by peroral or intraperitoneal administration of vitamin B6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *272*, 151–155. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. Kumrungsee, T.; Zhang, P.; Chartkul, M.; Yanaka, N.; Kato, N. Potential Role of Vitamin B6 in Ameliorating the Severity of COVID-19 and Its Complications. *Front. Nutr.* **2020**, *7*, 562051. [\[CrossRef\]](#)
125. León-Del-Río, A. Biotin in metabolism, gene expression, and human disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2019**, *42*, 647–654. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
126. Kuroishi, T. Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2015**, *93*, 1091–1096. [\[CrossRef\]](#)
127. Skupsky, J.; Sabui, S.; Hwang, M.; Nakasaki, M.; Cahalan, M.D.; Said, H.M. Biotin Supplementation Ameliorates Murine Colitis by Preventing NF- κ B Activation. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *9*, 557–567. [\[CrossRef\]](#)
128. Elahi, A.; Sabui, S.; Narasappa, N.N.; Agrawal, S.; Lambrecht, N.W.; Agrawal, A.; Said, H.M. Biotin Deficiency Induces Th1- and Th17-Mediated Proinflammatory Responses in Human CD4⁺ T Lymphocytes via Activation of the mTOR Signaling Pathway. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 2563–2570. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

129. Valentini, L.; Pinto, A.; Bourdel-Marchasson, I.; Ostan, R.; Brigidi, P.; Turrone, S.; Hrelia, S.; Hrelia, P.; Bereswill, S.; Fischer, A.; et al. Impact of personalized diet and probiotic supplementation on inflammation, nutritional parameters and intestinal microbiota—The “RISTOMED project”: Randomized controlled trial in healthy older people. *Clin. Nutr.* **2015**, *34*, 593–602. [\[CrossRef\]](#)
130. Morscher, R.J.; Ducker, G.S.; Li, S.H.J.; Mayer, J.A.; Gitai, Z.; Sperl, W.; Rabinowitz, J.D. Mitochondrial translation requires folate-dependent tRNA methylation. *Nature* **2018**, *554*, 128–132. [\[CrossRef\]](#)
131. Kapadia, C.R. Vitamin B12 in health and disease. Part I—Inherited disorders of function, absorption, and transport. *Gastroenterologist* **1995**, *3*, 329–344.
132. Kok, D.E.; Steegenga, W.T.; McKay, J.A. Folate and epigenetics: Why we should not forget bacterial biosynthesis. *Epigenomics* **2018**, *10*, 1147–1150. [\[CrossRef\]](#)
133. Bermingham, A.; Derrick, J.P. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: Evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *BioEssays* **2002**, *24*, 637–648. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
134. Martens, J.H.; Barg, H.; Warren, M.; Jahn, D. Microbial production of vitamin B12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 275–285. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
135. LeBlanc, J.G.; Milani, C.; de Giori, G.S.; Sesma, F.; van Sinderen, D.; Ventura, M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 160–168. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
136. Fang, H.; Kang, J.; Zhang, D. Microbial production of vitamin B12: A review and future perspectives. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, 15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
137. Corcoran, T.B.; O’Neill, M.P.; Webb, S.A.R.; Ho, K.M. Inflammation, vitamin deficiencies and organ failure in critically ill patients. *Anaesth. Intensive Care* **2009**, *37*, 740–747. [\[CrossRef\]](#)
138. Tal, S.; Shavit, Y.; Stern, F.; Malnick, S. Association between vitamin B12 levels and mortality in hospitalized older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2010**, *58*, 523–526. [\[CrossRef\]](#)
139. Abe, I.; Shirato, K.; Hashizume, Y.; Mitsuhashi, R.; Kobayashi, A.; Shiono, C.; Sato, S.; Tachiyashiki, K.; Imaizumi, K. Folate- deficiency induced cell-specific changes in the distribution of lymphocytes and granulocytes in rats. *Environ. Health Prev. Med.* **2013**, *18*, 78–84. [\[CrossRef\]](#)
140. Courtemanche, C.; Huang, A.C.; Elson-Schwab, I.; Kerry, N.; Ng, B.Y.; Ames, B.N. Folate deficiency and ionizing radiation caused DNA breaks in primary human lymphocytes: A comparison. *FASEB J.* **2004**, *18*, 209–211. [\[CrossRef\]](#)
141. Socha-Banasiak, A.; Kamer, B.; Gach, A.; Wysocka, U.; Jakubowski, L.; Głowacka, E.; Czekwianianc, E. Folate status, regulatory T cells and MTHFR C677T polymorphism study in allergic children. *Adv. Med. Sci.* **2016**, *61*, 300–305. [\[CrossRef\]](#)
142. Kunisawa, J.; Hashimoto, E.; Ishikawa, I.; Kiyono, H. A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32094. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
143. Xia, W.; Hilgenbrink, A.R.; Matteson, E.L.; Lockwood, M.B.; Cheng, J.X.; Low, P.S. A functional folate receptor is induced during macrophage activation and can be used to target drugs to activated macrophages. *Blood* **2009**, *113*, 438–446. [\[CrossRef\]](#)
144. Hilgendorf, I.; Swirski, F.K. Folate Receptor: A Macrophage “Achilles’ Heel”? *J. Am. Heart Assoc.* **2012**, *1*, e004036. [\[CrossRef\]](#)
145. Poh, S.; Putt, K.S.; Low, P.S. Folate-Targeted Dendrimers Selectively Accumulate at Sites of Inflammation in Mouse Models of Ulcerative Colitis and Atherosclerosis. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 3082–3088. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
146. Spiller, R. Serotonin, inflammation, and IBS: Fitting the jigsaw together? *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.* **2007**, *45*, S115–S119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
147. Heijtz, R.D.; Wang, S.; Anuar, F.; Qian, Y.; Björkholm, B.; Samuelsson, A.; Hibberd, M.L.; Forssberg, H.; Pettersson, S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3047–3052. [\[CrossRef\]](#)
148. Marcobal, A.; Kashyap, P.C.; Nelson, T.A.; Aronov, P.A.; Donia, M.S.; Spormann, A.; Fischbach, M.A.; Sonnenburg, J.L. A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. *ISMEJ.* **2013**, *7*, 1933–1943. [\[CrossRef\]](#)
149. Williams, B.B.; Van Benschoten, A.H.; Cimermancic, P.; Donia, M.S.; Zimmermann, M.; Taketani, M.; Ishihara, A.; Kashyap, P.C.; Fraser, J.S.; Fischbach, M.A. Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine. *Cell Host Microbe* **2014**, *16*, 495–503. [\[CrossRef\]](#)
150. Agus, A.; Planchais, J.; Sokol, H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe* **2018**, *23*, 716–724. [\[CrossRef\]](#)
151. Roager, H.M.; Licht, T.R. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
152. Gao, J.; Xu, K.; Liu, H.; Liu, G.; Bai, M.; Peng, C.; Li, T.; Yin, Y. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 13. [\[CrossRef\]](#)
153. Zelante, T.; Iannitti, R.G.; Cunha, C.; DeLuca, A.; Giovannini, G.; Pieraccini, G.; Zecchi, R.; D’Angelo, C.; Massi-Benedetti, C.; Fallarino, F.; et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* **2013**, *39*, 372–385. [\[CrossRef\]](#)
154. Venkatesh, M.; Mukherjee, S.; Wang, H.; Li, H.; Sun, K.; Benechet, A.P.; Qiu, Z.; Maher, L.; Redinbo, M.R.; Phillips, R.S.; et al. Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and toll-like receptor 4. *Immunity* **2014**, *41*, 296–310. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

155. Dodd, D.; Spitzer, M.H.; Van Treuren, W.; Merrill, B.D.; Hryckowian, A.J.; Higginbottom, S.K.; Le, A.; Cowan, T.M.; Nolan, G.P.; Fischbach, M.A.; et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature* **2017**, *551*, 648–652. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
156. Alexeev, E.E.; Lanis, J.M.; Kao, D.J.; Campbell, E.L.; Kelly, C.J.; Battista, K.D.; Gerich, M.E.; Jenkins, B.R.; Walk, S.T.; Kominsky, D.J.; et al. Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor. *Am. J. Pathol.* **2018**, *188*, 1183–1194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
157. Li, J.; Zhang, L.; Wu, T.; Li, Y.; Zhou, X.; Ruan, Z. Indole-3-propionic Acid Improved the Intestinal Barrier by Enhancing Epithelial Barrier and Mucus Barrier. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 1487–1495. [\[CrossRef\]](#)
158. Wlodarska, M.; Luo, C.; Kolde, R.; d’Hennzel, E.; Annand, J.W.; Heim, C.E.; Krastel, P.; Schmitt, E.K.; Omar, A.S.; Creasey, E.A.; et al. Indoleacrylic Acid Produced by Commensal *Peptostreptococcus* Species Suppresses Inflammation. *Cell Host Microbe* **2017**, *22*, 25–37.e6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
159. Marsland, B.J. Regulating inflammation with microbial metabolites. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 581–583. [\[CrossRef\]](#)
160. Huxtable, R.J. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* **1992**, *72*, 101–164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
161. Sturman, J.A. Taurine in development. *Physiol. Rev.* **1993**, *73*, 119–148. [\[CrossRef\]](#)
162. Trachtman, H.; Barbour, R.; Sturman, J.A.; Finberg, L. Taurine and osmoregulation: Taurine is a cerebral osmoprotective molecule in chronic hypernatremic dehydration. *Pediatr. Res.* **1988**, *23*, 35–39. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
163. Smith, B.F. Hepatology: A Textbook of Liver Disease. *Arch. Intern. Med.* **1983**, *143*, 2238. [\[CrossRef\]](#)
164. Hardison, W.G.M. Hepatic Taurine Concentration and Dietary Taurine as Regulators of Bile Acid Conjugation with Taurine. *Gastroenterology* **1978**, *75*, 71–75. [\[CrossRef\]](#)
165. Sjövall, J. Dietary Glycine and Taurine on Bile Acid Conjugation in Man. Bile Acids and Steroids 75. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1959**, *100*, 676–678. [\[CrossRef\]](#)
166. Fang, H.; Meng, F.; Piao, F.; Jin, B.; Li, M.; Li, W. Effect of Taurine on Intestinal Microbiota and Immune Cells in Peyer’s Patches of Immunosuppressive Mice. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer: New York, NY, USA, 2019; Volume 1155, pp. 13–24.
167. Levy, M.; Thaïss, C.A.; Zeevi, D.; Dohnalová, L.; Zilberman-Schapira, G.; Mahdi, J.A.; David, E.; Savidor, A.; Korem, T.; Herzig, Y.; et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* **2015**, *163*, 1428–1443. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
168. Aronov, P.A.; Luo, F.J.G.; Plummer, N.S.; Quan, Z.; Holmes, S.; Hostetter, T.H.; Meyer, T.W. Colonic contribution to uremic solutes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *22*, 1769–1776. [\[CrossRef\]](#)
169. Saito, Y.; Sato, T.; Nomoto, K.; Tsuji, H. Identification of phenol- and p-cresol-producing intestinal bacteria by using media supplemented with tyrosine and its metabolites. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *94*, 125. [\[CrossRef\]](#)
170. Gryp, T.; Vanholder, R.; Vanechoutte, M.; Glorieux, G. P-Cresyl Sulfate. *Toxins* **2017**, *9*, 52. [\[CrossRef\]](#)
171. Dalrymple, L.S.; Go, A.S. Epidemiology of acute infections among patients with chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *3*, 1487–1493. [\[CrossRef\]](#)
172. Azevedo, M.L.V.; Bonan, N.B.; Dias, G.; Brehm, F.; Steiner, T.M.; Souza, W.M.; Stinghen, A.E.M.; Barreto, F.C.; Elifio-Esposito, S.; Pecoits-Filho, R.; et al. p-Cresyl sulfate affects the oxidative burst, phagocytosis process, and antigen presentation of monocyte-derived macrophages. *Toxicol. Lett.* **2016**, *263*, 1–5. [\[CrossRef\]](#)
173. Shiba, T.; Makino, I.; Sasaki, T.; Fukuhara, Y.; Kawakami, K.; Kato, I.; Kobayashi, T. p-Cresyl sulfate decreases peripheral B cells in mice with adenine-induced renal dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *342*, 50–59. [\[CrossRef\]](#)
174. Shiba, T.; Kawakami, K.; Sasaki, T.; Makino, I.; Kato, I.; Kobayashi, T.; Uchida, K.; Kaneko, K. Effects of intestinal bacteria-derived p-cresyl sulfate on Th1-type immune response in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *274*, 191–199. [\[CrossRef\]](#)
175. Vanholder, R.; Bammens, B.; De Loor, H.; Glorieux, G.; Meijers, B.; Schepers, E.; Massy, Z.; Evenepoel, P. Warning: The unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2011**, *26*, 1464–1467. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
176. Sudo, N. Biogenic Amines: Signals Between Commensal Microbiota and Gut Physiology. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 504. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
177. Jutel, M.; Watanabe, T.; Klunker, S.; Akdis, M.; Thomet, O.A.R.; Malolepszy, J.; Zak-Nejmark, T.; Koga, R.; Kobayashi, T.; Blaser, K.; et al. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* **2001**, *413*, 420–425. [\[CrossRef\]](#)
178. Yoshimoto, T.; Tsutsui, H.; Tominaga, K.; Hoshino, K.; Okamura, H.; Akira, S.; Paul, W.E.; Nakanishi, K. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13962–13966. [\[CrossRef\]](#)
179. BEAVER, M.H.; WOSTMANN, B.S. Histamine and 5-Hydroxytryptamine in the Intestinal Tract of Germ-Free Animals, Animals Harboring One Microbial Species and Conventional Animals. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1962**, *19*, 385–393. [\[CrossRef\]](#)
180. Barcik, W.; Pugin, B.; Westermann, P.; Perez, N.R.; Ferstl, R.; Wawrzyniak, M.; Smolinska, S.; Jutel, M.; Hessel, E.M.; Michalovich, D.; et al. Histamine-secreting microbes are increased in the gut of adult asthma patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *138*, 1491–1494.e7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
181. Caron, G.; Delneste, Y.; Roelandts, E.; Duez, C.; Herbault, N.; Magistrelli, G.; Bonnefoy, J.-Y.; Pestel, J.; Jeannin, P. Histamine Induces CD86 Expression and Chemokine Production by Human Immature Dendritic Cells. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 6000–6006. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

182. Mazzoni, A.; Young, H.A.; Spitzer, J.H.; Visintin, A.; Segal, D.M. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J. Clin. Investig.* **2001**, *108*, 1865–1873. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
183. Van Der Pouw Kraan, T.C.T.M.; Sniijders, A.; Boeijs, L.C.M.; De Groot, E.R.; Alewijnse, A.E.; Leurs, R.; Aarden, L.A. Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors. *J. Clin. Investig.* **1998**, *102*, 1866–1873. [\[CrossRef\]](#)
184. Noubade, R.; Milligan, G.; Zachary, J.F.; Blankenhorn, E.P.; Del Rio, R.; Rincon, M.; Teuscher, C. Histamine receptor H1 is required for TCR-mediated p38 MAPK activation and optimal IFN- γ production in mice. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 3507–3518. [\[CrossRef\]](#)
185. Barcik, W.; Pugin, B.; Brescó, M.S.; Westermann, P.; Rinaldi, A.; Groeger, D.; Van Elst, D.; Sokolowska, M.; Krawczyk, K.; Frei, R.; et al. Bacterial secretion of histamine within the gut influences immune responses within the lung. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *74*, 899–909. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
186. Igarashi, K.; Kashiwagi, K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 39–51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
187. Milovic, V. Polyamines in the gut lumen: Bioavailability and biodistribution. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2001**, *13*, 1021–1025. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
188. Ramos-Molina, B.; Queipo-Ortuño, M.I.; Lambertos, A.; Tinahones, F.J.; Peñafiel, R. Dietary and gut microbiota polyamines in obesity- And age-related diseases. *Front. Nutr.* **2019**, *6*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
189. Nakamura, A.; Ooga, T.; Matsumoto, M. Intestinal luminal putrescine is produced by collective biosynthetic pathways of the commensal microbiome. *Gut Microbes* **2019**, *10*, 159–171. [\[CrossRef\]](#)
190. Matsumoto, M.; Benno, Y. The relationship between microbiota and polyamine concentration in the human intestine: A pilot study. *Microbiol. Immunol.* **2007**, *51*, 25–35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
191. Zhang, M.; Borovikova, L.V.; Wang, H.; Metz, C.; Tracey, K.J. Spermine inhibition of monocyte activation and inflammation. *Mol. Med.* **1999**, *5*, 595–605. [\[CrossRef\]](#)
192. Zhang, M.; Caragine, T.; Wang, H.; Cohen, P.S.; Botchkina, G.; Soda, K.; Bianchi, M.; Ulrich, P.; Cerami, A.; Sherry, B.; et al. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: A counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 1759–1768. [\[CrossRef\]](#)
193. Zhu, S.; Ashok, M.; Li, J.; Li, W.; Yang, H.; Wang, P.; Tracey, K.J.; Sama, A.E.; Wang, H. Spermine protects mice against lethal sepsis partly by attenuating surrogate inflammatory markers. *Mol. Med.* **2009**, *15*, 275–282. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
194. Soda, K.; Dobashi, Y.; Kano, Y.; Tsujinaka, S.; Konishi, F. Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Exp. Gerontol.* **2009**, *44*, 727–732. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
195. Eisenberg, T.; Knauer, H.; Schauer, A.; Büttner, S.; Ruckenstuhl, C.; Carmona-Gutierrez, D.; Ring, J.; Schroeder, S.; Magnes, C.; Antonacci, L.; et al. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 1305–1314. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
196. Kibe, R.; Kurihara, S.; Sakai, Y.; Suzuki, H.; Ooga, T.; Sawaki, E.; Muramatsu, K.; Nakamura, A.; Yamashita, A.; Kitada, Y.; et al. Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
197. Eisenberg, T.; Abdellatif, M.; Schroeder, S.; Primessnig, U.; Stekovic, S.; Pendl, T.; Harger, A.; Schipke, J.; Zimmermann, A.; Schmidt, A.; et al. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 1428–1438. [\[CrossRef\]](#)
198. Madeo, F.; Eisenberg, T.; Pietrocola, F.; Kroemer, G. Spermidine in health and disease. *Science* **2018**, *359*, 6374. [\[CrossRef\]](#)
199. Carriche, G.M.; Almeida, L.; Stüve, P.; Velasquez, L.; Dhillon-LaBrooy, A.; Roy, U.; Lindenberg, M.; Strowig, T.; Plaza-Sirvent, C.; Schmitz, I.; et al. Regulating T-cell differentiation through the polyamine spermidine. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *147*, 335–348.e11. [\[CrossRef\]](#)
200. Morón, B.; Spalinger, M.; Kasper, S.; Atrott, K.; Frey-Wagner, I.; Fried, M.; McCole, D.F.; Rogler, G.; Scharl, M. Activation of Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 2 by Spermidine Exerts Anti-Inflammatory Effects in Human THP-1 Monocytes and in a Mouse Model of Acute Colitis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73703. [\[CrossRef\]](#)
201. Madeo, F.; Bauer, M.A.; Carmona-Gutierrez, D.; Kroemer, G. Spermidine: A physiological autophagy inducer acting as an anti-aging vitamin in humans? *Autophagy* **2019**, *15*, 165–168. [\[CrossRef\]](#)
202. Wirth, M.; Schwarz, C.; Benson, G.; Horn, N.; Buchert, R.; Lange, C.; Köbe, T.; Hetzer, S.; Maglione, M.; Michael, E.; et al. Effects of spermidine supplementation on cognition and biomarkers in older adults with subjective cognitive decline (SmartAge)—Study protocol for a randomized controlled trial. *Alzheimer's Res. Ther.* **2019**, *11*, 36. [\[CrossRef\]](#)
203. Wolosker, H.; Dumin, E.; Balan, L.; Foltyn, V.N. D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS J.* **2008**, *275*, 3514–3526. [\[CrossRef\]](#)
204. Cava, F.; Lam, H.; De Pedro, M.A.; Waldor, M.K. Emerging knowledge of regulatory roles of d-amino acids in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 817–831. [\[CrossRef\]](#)
205. Sasabe, J.; Miyoshi, Y.; Rakoff-Nahoum, S.; Zhang, T.; Mita, M.; Davis, B.M.; Hamase, K.; Waldor, M.K. Interplay between microbial d-amino acids and host d-amino acid oxidase modifies murine mucosal defence and gut microbiota. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
206. Sasabe, J.; Suzuki, M. Emerging role of D-Amino acid metabolism in the innate defense. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 933. [\[CrossRef\]](#)

207. Yunes, R.A.; Poluektova, E.U.; Dyachkova, M.S.; Klimina, K.M.; Kovtun, A.S.; Averina, O.V.; Orlova, V.S.; Danilenko, V.N. GABA production and structure of gadB/gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota. *Anaerobe* **2016**, *42*, 197–204. [CrossRef] [PubMed]
208. Kurihara, S.; Oda, S.; Tsuboi, Y.; Hyeon, G.K.; Oshida, M.; Kumagai, H.; Suzuki, H. γ -glutamylputrescine synthetase in the putrescine utilization pathway of Escherichia coli K-12. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 19981–19990. [CrossRef] [PubMed]
209. Barrett, E.; Ross, R.P.; O'Toole, P.W.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C. γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, 411–417. [CrossRef] [PubMed]
210. Matsumoto, M.; Ooga, T.; Kibe, R.; Aiba, Y.; Koga, Y.; Benno, Y. Colonic absorption of low-molecular-weight metabolites influenced by the intestinal microbiome: A pilot study. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169207. [CrossRef]
211. Ren, W.; Yin, J.; Xiao, H.; Chen, S.; Liu, G.; Tan, B.; Li, N.; Peng, Y.; Li, T.; Zeng, B.; et al. Intestinal microbiota-derived GABA mediates interleukin-17 expression during enterotoxigenic Escherichia coli infection. *Front. Immunol.* **2017**, *7*, 685. [CrossRef]
212. Braun, H.S.; Sponder, G.; Pieper, R.; Aschenbach, J.R.; Deiner, C. GABA selectively increases mucin-1 expression in isolated pig jejunum. *Genes Nutr.* **2015**, *10*, 1–8. [CrossRef]
213. Bajic, S.S.; Djokic, J.; Dinic, M.; Veljovic, K.; Golic, N.; Mihajlovic, S.; Tolinacki, M. GABA-producing natural dairy isolate from artisanal zlatar cheese attenuates gut inflammation and strengthens gut epithelial barrier in vitro. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 527. [CrossRef]
214. Thompson, J.A.; Oliveira, R.A.; Xavier, K.B. Chemical conversations in the gut microbiota. *Gut Microbes* **2016**, *7*, 163–170. [CrossRef] [PubMed]
215. Papenfort, K.; Bassler, B.L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 576–588. [CrossRef]
216. Bhatt, V.S. Quorum sensing mechanisms in gram positive bacteria. In *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence*; Springer: Singapore, 2019; pp. 297–311. ISBN 9789811324291.
217. Xavier, K.B.; Bassler, B.L. Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. *Nature* **2005**, *437*, 750–753. [CrossRef] [PubMed]
218. Thompson, J.A.; Oliveira, R.A.; Djukovic, A.; Ubeda, C.; Xavier, K.B. Manipulation of the quorum sensing signal AI-2 affects the antibiotic-treated gut microbiota. *Cell Rep.* **2015**, *10*, 1861–1871. [CrossRef]
219. Li, Q.; Ren, Y.; Fu, X. Inter-kingdom signaling between gut microbiota and their host. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 2383–2389. [CrossRef] [PubMed]
220. Pundir, P.; Liu, R.; Vasavda, C.; Serhan, N.; Limjunyawong, N.; Yee, R.; Zhan, Y.; Dong, X.; Wu, X.; Zhang, Y.; et al. A Connective Tissue Mast-Cell-Specific Receptor Detects Bacterial Quorum-Sensing Molecules and Mediates Antibacterial Immunity. *Cell Host Microbe* **2019**, *26*, 114–122.e8. [CrossRef]
221. Li, Q.; Peng, W.; Wu, J.; Wang, X.; Ren, Y.; Li, H.; Peng, Y.; Tang, X.; Fu, X. Autoinducer-2 of gut microbiota, a potential novel marker for human colorectal cancer, is associated with the activation of TNFSF9 signaling in macrophages. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1626192. [CrossRef]
222. Goldstein, D.S.; Eisenhofer, G.; Kopin, I.J. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *305*, 800–811. [CrossRef]
223. Flierl, M.A.; Rittirsch, D.; Nadeau, B.A.; Chen, A.J.; Sarma, J.V.; Zetoune, F.S.; McGuire, S.R.; List, R.P.; Day, D.E.; Hoesel, L.M.; et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* **2007**, *449*, 721–725. [CrossRef]
224. Costa, M.; Brookes, S.J.H.; Hennig, G.W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* **2000**, *47*, iv15–iv19. [CrossRef]
225. Eisenhofer, G.; Aneman, Å.; Friberg, P.; Hooper, D.; Fändriks, L.; Lonroth, H.; Hunyady, B.; Mezey, E. Substantial production of Dopamine in the human gastrointestinal tract. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 3864–3871. [CrossRef] [PubMed]
226. Furness, J.B. The Enteric Nervous System. Available online: <https://www.wiley.com/en-us/The+Enteric+Nervous+System-p-9781405133760> (accessed on 14 May 2021).
227. Sandrini, S.; Aldriwesh, M.; Alruways, M.; Freestone, P. Microbial endocrinology: Host-bacteria communication within the gut microbiome. *J. Endocrinol.* **2015**, *225*, R21–R34. [CrossRef]
228. Patel, P.; Nankova, B.B.; LaGamma, E.F. Butyrate, a gut-derived environmental signal, regulates tyrosine hydroxylase gene expression via a novel promoter element. *Dev. Brain Res.* **2005**, *160*, 53–62. [CrossRef]
229. Tsavkelova, E.A.; Klimova, S.Y.; Cherdyntseva, T.A.; Netrusov, A.I. Hormones and hormone-like substances of microorganisms: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2006**, *42*, 229–235. [CrossRef]
230. Asano, Y.; Hiramoto, T.; Nishino, R.; Aiba, Y.; Kimura, T.; Yoshihara, K.; Koga, Y.; Sudo, N. Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2012**, *303*, 1288–1295. [CrossRef]
231. Eisenhofer, G.; Kopin, I.J.; Goldstein, D.S. Catecholamine metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 331–349. [CrossRef] [PubMed]
232. Lyte, M.; Ernst, S. Alpha and beta adrenergic receptor involvement in catecholamine-induced growth of gram-negative bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *190*, 447–452. [CrossRef]
233. Lyte, M.; Ernst, S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci.* **1992**, *50*, 203–212. [CrossRef]

234. Sperandio, V.; Torres, A.G.; Jarvis, B.; Nataro, J.P.; Kaper, J.B. Bacteria-host communication: The language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8951–8956. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
235. Clarke, M.B.; Hughes, D.T.; Zhu, C.; Boedeker, E.C.; Sperandio, V. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10420–10425. [\[CrossRef\]](#)
236. Bearson, B.L.; Bearson, S.M.D. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb. Pathog.* **2008**, *44*, 271–278. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
237. Moreira, C.G.; Weinshenker, D.; Sperandio, V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* **2010**, *78*, 914–926. [\[CrossRef\]](#)
238. Gart, E.V.; Suchodolski, J.S.; Welsh, T.H.; Alaniz, R.C.; Randel, R.D.; Lawhon, S.D. *Salmonella typhimurium* and multidirectional communication in the gut. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1827. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
239. Madden, K.S.; Sanders, V.M.; Felten, D.L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1995**, *35*, 417–448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
240. Sanders, V.M.; Straub, R.H. Norepinephrine, the β -adrenergic receptor, and immunity. *Brain. Behav. Immun.* **2002**, *16*, 290–332. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
241. Ottaway, C.A.; Husband, A.J. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol. Today* **1994**, *15*, 511–517. [\[CrossRef\]](#)
242. Elenkov, I.J.; Wilder, R.L.; Chrousos, G.P.; Vizi, E.S. The sympathetic nerve—An integrative interface between two supersystems: The brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 595–638.
243. Flierl, M.A.; Rittirsch, D.; Huber-Lang, M.; Vidya Sarma, J.; Award, P. Catecholamines—Crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening Pandora’s box? *Mol. Med.* **2008**, *14*, 195–204. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
244. Brown, S.W.; Meyers, R.T.; Brennan, K.M.; Rumble, J.M.; Narasimhachari, N.; Perozzi, E.F.; Ryan, J.J.; Stewart, J.K.; Fischer-Stenger, K. Catecholamines in a macrophage cell line. *J. Neuroimmunol.* **2003**, *135*, 47–55. [\[CrossRef\]](#)
245. Lyte, M.; Bailey, M.T. Neuroendocrine-bacterial interactions in a neurotoxin-induced model of trauma. *J. Surg. Res.* **1997**, *70*, 195–201. [\[CrossRef\]](#)
246. Corrigan, R.M.; Gründling, A. Cyclic di-AMP: Another second messenger enters the fray. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 513–524. [\[CrossRef\]](#)
247. Woodward, J.J.; Lavarone, A.T.; Portnoy, D.A. C-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* **2010**, *328*, 1703–1705. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
248. McFarland, A.P.; Luo, S.; Ahmed-Qadri, F.; Zuck, M.; Thayer, E.F.; Goo, Y.A.; Hybiske, K.; Tong, L.; Woodward, J.J. Sensing of Bacterial Cyclic Dinucleotides by the Oxidoreductase RECON Promotes NF- κ B Activation and Shapes a Proinflammatory Antibacterial State. *Immunity* **2017**, *46*, 433–445. [\[CrossRef\]](#)
249. Whiteley, A.T.; Eaglesham, J.B.; de Oliveira Mann, C.C.; Morehouse, B.R.; Lowey, B.; Nieminen, E.A.; Danilchanka, O.; King, D.S.; Lee, A.S.Y.; Mekalanos, J.J.; et al. Bacterial cGAS-like enzymes synthesize diverse nucleotide signals. *Nature* **2019**, *567*, 194–199. [\[CrossRef\]](#)
250. Mager, L.F.; Burkhard, R.; Pett, N.; Cooke, N.C.A.; Brown, K.; Ramay, H.; Paik, S.; Stagg, J.; Groves, R.A.; Gallo, M.; et al. Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science* **2020**, *369*, 1481–1489. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
251. Kim, I.; Ahn, S.H.; Inagaki, T.; Choi, M.; Ito, S.; Guo, G.L.; Kliewer, S.A.; Gonzalez, F.J. Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 2664–2672. [\[CrossRef\]](#)
252. Fiorucci, S.; Biagioli, M.; Zampella, A.; Distrutti, E. Bile acids activated receptors regulate innate immunity. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
253. Cipriani, S.; Mencarelli, A.; Chini, M.G.; Distrutti, E.; Renga, B.; Bifulco, G.; Baldelli, F.; Donini, A.; Fiorucci, S. The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25637. [\[CrossRef\]](#)
254. Mencarelli, A.; Renga, B.; Migliorati, M.; Cipriani, S.; Distrutti, E.; Santucci, L.; Fiorucci, S. The Bile Acid Sensor Farnesoid X Receptor Is a Modulator of Liver Immunity in a Rodent Model of Acute Hepatitis. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 6657–6666. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
255. Gadaleta, R.M.; Van Erpecum, K.J.; Oldenburg, B.; Willemsen, E.C.L.; Renooij, W.; Murzilli, S.; Klomp, L.W.J.; Siersema, P.D.; Schipper, M.E.I.; Danese, S.; et al. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut* **2011**, *60*, 463–472. [\[CrossRef\]](#)
256. Song, X.; Sun, X.; Oh, S.F.; Wu, M.; Zhang, Y.; Zheng, W.; Geva-Zatorsky, N.; Jupp, R.; Mathis, D.; Benoist, C.; et al. Microbial bile acid metabolites modulate gut ROR γ regulatory T cell homeostasis. *Nature* **2020**, *577*, 410–415. [\[CrossRef\]](#)
257. Yang, B.H.; Hagemann, S.; Mamareli, P.; Lauer, U.; Hoffmann, U.; Beckstette, M.; Föhse, L.; Prinz, I.; Pezoldt, J.; Suerbaum, S.; et al. Foxp3 $^{+}$ T cells expressing ROR γ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* **2016**, *9*, 444–457. [\[CrossRef\]](#)
258. Campbell, C.; McKenney, P.T.; Konstantinovskiy, D.; Isaeva, O.I.; Schizas, M.; Verter, J.; Mai, C.; Jin, W.B.; Guo, C.J.; Violante, S.; et al. Bacterial metabolism of bile acids promotes generation of peripheral regulatory T cells. *Nature* **2020**, *581*, 475–479. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

259. Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 175–191. [CrossRef] [PubMed]
260. MacEyka, M.; Spiegel, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* **2014**, *510*, 58–67. [CrossRef]
261. Abdel Hadi, L.; Di Vito, C.; Riboni, L. Fostering Inflammatory Bowel Disease: Sphingolipid Strategies to Join Forces. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*. [CrossRef]
262. Stoffel, W.; Dittmar, K.; Wilmes, R. Sphingolipid Metabolism in Bacteroidaceae. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **1975**, *356*, 715–726. [CrossRef]
263. LaBach, J.P.; White, D.C. Identification of ceramide phosphorylethanolamine and ceramide phosphorylglycerol in the lipids of an anaerobic bacterium. *J. Lipid Res.* **1969**, *10*, 528–534. [CrossRef]
264. Ana, D.; Na, C.; Bielawski, J.; Hannun, Y.A.; Kasper, D.L. Membrane sphingolipids as essential molecular signals for Bacteroidessurvival in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4666–4671. [CrossRef]
265. Hickey, C.A.; Kuhn, K.A.; Donermeyer, D.L.; Porter, N.T.; Jin, C.; Cameron, E.A.; Jung, H.; Kaiko, G.E.; Wegorzewska, M.; Malvin, N.P.; et al. Colitogenic Bacteroides thetaiotaomicron antigens access host immune cells in a sulfatase-dependent manner via outer membrane vesicles. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 672–680. [CrossRef]
266. Kinjo, Y.; Wu, D.; Kim, G.; Xing, G.W.; Poles, M.A.; Ho, D.D.; Tsuji, M.; Kawahara, K.; Wong, C.H.; Kronenberg, M. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* **2005**, *434*, 520–525. [CrossRef]
267. An, D.; Oh, S.F.; Olszak, T.; Neves, J.F.; Avci, F.Y.; Erturk-Hasdemir, D.; Lu, X.; Zeissig, S.; Blumberg, R.S.; Kasper, D.L. Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell* **2014**, *156*, 123–133. [CrossRef]
268. Olszak, T.; An, D.; Zeissig, S.; Vera, M.P.; Richter, J.; Franke, A.; Glickman, J.N.; Siebert, R.; Baron, R.M.; Kasper, D.L.; et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* **2012**, *336*, 489–493. [CrossRef] [PubMed]
269. Brown, E.M.; Ke, X.; Hitchcock, D.; Jeanfavre, S.; Avila-Pacheco, J.; Nakata, T.; Arthur, T.D.; Fornelos, N.; Heim, C.; Franzosa, E.A.; et al. Bacteroides-Derived Sphingolipids Are Critical for Maintaining Intestinal Homeostasis and Symbiosis. *Cell Host Microbe* **2019**, *25*, 668–680. [CrossRef] [PubMed]
270. Cleveland, R.F.; Holtje, J.V.; Wicken, A.J.; Tomasz, A.; Daneo-Moore, L.; Shockman, G.D. Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *67*, 1128–1135. [CrossRef]
271. Fischer, W. Bacterial Phosphoglycolipids and Lipoteichoic Acids. In *Glycolipids, Phosphoglycolipids, and Sulfoglycolipids*; Springer: New York, NY, USA, 1990; pp. 123–234.
272. Brown, S.; Santa Maria, J.P.; Walker, S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67*, 313–336. [CrossRef] [PubMed]
273. Vasselon, T.; Detmers, P.A. Toll receptors: A central element in innate immune responses. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 1033–1041. [CrossRef] [PubMed]
274. Draing, C.; Pfitzenmaier, M.; Zummo, S.; Mancuso, G.; Geyer, A.; Hartung, T.; Von Aulock, S. Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of Streptococcus pneumoniae. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 33849–33859. [CrossRef]
275. Schröder, N.W.J.; Morath, S.; Alexander, C.; Hamann, L.; Hartung, T.; Zähringer, U.; Göbel, U.B.; Weber, J.R.; Schumann, R.R. Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15587–15594. [CrossRef]
276. Triantafyllou, M.; Manukyan, M.; Mackie, A.; Morath, S.; Hartung, T.; Heine, H.; Triantafyllou, K. Lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 40882–40889. [CrossRef]
277. Michelsen, K.S.; Aicher, A.; Mohaupt, M.; Hartung, T.; Dimmeler, S.; Kirschning, C.J.; Schumann, R.R. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs): Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 25680–25686. [CrossRef] [PubMed]
278. Hong, S.W.; Baik, J.E.; Kang, S.S.; Yun, C.H.; Seo, D.G.; Han, S.H. Lipoteichoic acid of Streptococcus mutans interacts with Toll-like receptor 2 through the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macrophages. *Mol. Immunol.* **2014**, *57*, 284–291. [CrossRef]
279. Dunne, D.W.; Resnick, D.; Greenberg, J.; Krieger, M.; Joiner, K.A. The type I macrophage scavenger receptor binds to Gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1863–1867. [CrossRef] [PubMed]
280. Ellingsen, E.; Morath, S.; Flo, T.; Schromm, A.; Hartung, T.; Thiernemann, C.; Espevik, T.; Golenbock, D.; Foster, D.; Solberg, R.; et al. Induction of Cytokine Production in Human T Cells and Monocytes by Highly Purified Lipoteichoic Acid: Involvement of Toll-Like Receptors and CD14. Available online: <https://www.medscimonit.com/download/index/idArt/420854> (accessed on 15 May 2021).
281. von Aulock, S.; Morath, S.; Hareng, L.; Knapp, S.; van Kessel, K.P.M.; van Strijp, J.A.G.; Hartung, T. Lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus is a potent stimulus for neutrophil recruitment. *Immunobiology* **2003**, *208*, 413–422. [CrossRef] [PubMed]
282. Wang, J.E.; Dahle, M.K.; McDonald, M.; Foster, S.J.; Aasen, A.O.; Thiernemann, C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: Receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock* **2003**, *20*, 402–414. [CrossRef]

283. Hara, H.; Seregin, S.S.; Yang, D.; Fukase, K.; Chamaillard, M.; Alnemri, E.S.; Inohara, N.; Chen, G.Y.; Núñez, G. The NLRP6 Inflammasome Recognizes Lipoteichoic Acid and Regulates Gram-Positive Pathogen Infection. *Cell* **2018**, *175*, 1651–1664.e14. [\[CrossRef\]](#)
284. Delgado, S.; Sánchez, B.; Margolles, A.; Ruas-Madiedo, P.; Ruiz, L. Molecules produced by probiotics and intestinal microorganisms with immunomodulatory activity. *Nutrients* **2020**, *12*, 391. [\[CrossRef\]](#)
285. Riehl, T.E.; Alvarado, D.; Ee, X.; Zuckerman, A.; Foster, L.; Kapoor, V.; Thotala, D.; Ciorba, M.A.; Stenson, W.F. Lactobacillus rhamnosus GG protects the intestinal epithelium from radiation injury through release of lipoteichoic acid, macrophage activation and the migration of mesenchymal stem cells. *Gut* **2019**, *68*, 1003–1013. [\[CrossRef\]](#)
286. Peña, J.A.; Versalovic, J. Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF- α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell. Microbiol.* **2003**, *5*, 277–285. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
287. Wang, S.; Ahmadi, S.; Nagpal, R.; Jain, S.; Mishra, S.P.; Kavanagh, K.; Zhu, X.; Wang, Z.; McClain, D.A.; Kritchevsky, S.B.; et al. Lipoteichoic acid from the cell wall of a heat killed Lactobacillus paracasei D3-5 ameliorates aging-related leaky gut, inflammation and improves physical and cognitive functions: From C. elegans to mice. *GeroScience* **2020**, *42*, 333–352. [\[CrossRef\]](#)
288. Grangette, C.; Nutten, S.; Palumbo, E.; Morath, S.; Hermann, C.; Dewulf, J.; Pot, B.; Hartung, T.; Hols, P.; Mercenier, A. Enhanced antiinflammatory capacity of a Lactobacillus plantarum mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10321–10326. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
289. Melmed, G.; Thomas, L.S.; Lee, N.; Tesfay, S.Y.; Lukasek, K.; Michelsen, K.S.; Zhou, Y.; Hu, B.; Ardit, M.; Abreu, M.T. Human Intestinal Epithelial Cells Are Broadly Unresponsive to Toll-Like Receptor 2-Dependent Bacterial Ligands: Implications for Host-Microbial Interactions in the Gut. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 1406–1415. [\[CrossRef\]](#)
290. Ott, S.J.; Musfeldt, M.; Wenderoth, D.F.; Hampe, J.; Brant, O.; Fölsch, U.R.; Timmis, K.N.; Schreiber, S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* **2004**, *53*, 685–693. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
291. Manichanh, C.; Rigottier-Gois, L.; Bonnaud, E.; Gloux, K.; Pelletier, E.; Frangeul, L.; Nalin, R.; Jarrin, C.; Chardon, P.; Marteau, P.; et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **2006**, *55*, 205–211. [\[CrossRef\]](#)
292. Sokol, H.; Seksik, P.; Rigottier-Gois, L.; Lay, C.; Lepage, P.; Podglajen, I.; Marteau, P.; Doré, J. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2006**, *12*, 106–111. [\[CrossRef\]](#)
293. Roy, U.; Gálvez, E.J.C.; Iljazovic, A.; Lesker, T.R.; Błazejewski, A.J.; Pils, M.C.; Heise, U.; Huber, S.; Flavell, R.A.; Strowig, T. Distinct Microbial Communities Trigger Colitis Development upon Intestinal Barrier Damage via Innate or Adaptive Immune Cells. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 994–1008. [\[CrossRef\]](#)
294. Schirmer, M.; Franzosa, E.A.; Lloyd-Price, J.; McIver, L.J.; Schwager, R.; Poon, T.W.; Ananthakrishnan, A.N.; Andrews, E.; Barron, G.; Lake, K.; et al. Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 337–346. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
295. Patwa, L.G.; Fan, T.J.; Tchaptchet, S.; Liu, Y.; Lussier, Y.A.; Sartor, R.B.; Hansen, J.J. Chronic intestinal inflammation induces stress-response genes in commensal Escherichia coli. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 1842–1851. [\[CrossRef\]](#)
296. Iliot, N.E.; Bollrath, J.; Danne, C.; Schiering, C.; Shale, M.; Adelman, K.; Krausgruber, T.; Heger, A.; Sims, D.; Powrie, F. Defining the microbial transcriptional response to colitis through integrated host and microbiome profiling. *ISME J.* **2016**, *10*, 2389–2404. [\[CrossRef\]](#)
297. Becattini, S.; Sorbara, M.T.; Kim, S.G.; Littmann, E.L.; Dong, Q.; Walsh, G.; Wright, R.; Amoretti, L.; Fontana, E.; Hohl, T.M.; et al. Rapid transcriptional and metabolic adaptation of intestinal microbes to host immune activation. *Cell Host Microbe* **2021**, *29*, 378–393.e5. [\[CrossRef\]](#)
298. Cash, H.L.; Whitham, C.V.; Behrendt, C.L.; Hooper, L.V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* **2006**, *313*, 1126–1130. [\[CrossRef\]](#)
299. Rubino, S.J.; Geddes, K.; Girardin, S.E. Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens. *Trends Immunol.* **2012**, *33*, 112–118. [\[CrossRef\]](#)
300. Bouskra, D.; Brézillon, C.; Bérard, M.; Werts, C.; Varona, R.; Boneca, I.G.; Eberl, G. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* **2008**, *456*, 507–510. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
301. Salzman, N.H.; Bevins, C.L. Dysbiosis—A consequence of Paneth cell dysfunction. *Semin. Immunol.* **2013**, *25*, 334–341. [\[CrossRef\]](#)
302. Ehmann, D.; Wendler, J.; Koeninger, L.; Larsen, I.S.; Klag, T.; Berger, J.; Marette, A.; Schaller, M.; Stange, E.F.; Malek, N.P.; et al. Paneth cell α -defensins HD-5 and HD-6 display differential degradation into active antimicrobial fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 3746–3751. [\[CrossRef\]](#)
303. Bantug, G.R.; Galluzzi, L.; Kroemer, G.; Hess, C. The spectrum of T cell metabolism in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 19–34. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
304. Deaglio, S.; Dwyer, K.M.; Gao, W.; Friedman, D.; Usheva, A.; Erat, A.; Chen, J.F.; Enyoyi, K.; Linden, J.; Oukka, M.; et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 1257–1265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
305. Hill, J.A.; Hall, J.A.; Sun, C.M.; Cai, Q.; Ghyselinck, N.; Chambon, P.; Belkaid, Y.; Mathis, D.; Benoist, C. Retinoic Acid Enhances Foxp3 Induction Indirectly by Relieving Inhibition from CD4⁺CD44^{hi} Cells. *Immunity* **2008**, *29*, 758–770. [\[CrossRef\]](#)

306. Goverse, G.; Labao-Almeida, C.; Ferreira, M.; Molenaar, R.; Wahlen, S.; Konijn, T.; Koning, J.; Veiga-Fernandes, H.; Mebius, R.E. Vitamin A Controls the Presence of ROR γ + Innate Lymphoid Cells and Lymphoid Tissue in the Small Intestine. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 5148–5155. [CrossRef]
307. Mucida, D.; Park, Y.; Kim, G.; Turovskaya, O.; Scott, I.; Kronenberg, M.; Cheroutre, H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* **2007**, *317*, 256–260. [CrossRef] [PubMed]
308. Jaensson-Gyllenbäck, E.; Kotarsky, K.; Zapata, F.; Persson, E.K.; Gundersen, T.E.; Blomhoff, R.; Agace, W.W. Bile retinoids imprint intestinal CD103+ dendritic cells with the ability to generate gut-tropic T cells. *Mucosal Immunol.* **2011**, *4*, 438–447. [CrossRef]
309. Mielke, L.A.; Jones, S.A.; Raverdeau, M.; Higgs, R.; Stefanska, A.; Groom, J.R.; Misiak, A.; Dungan, L.S.; Sutton, C.E.; Streubel, G.; et al. Retinoic acid expression associates with enhanced IL-22 production by $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells and attenuation of intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 1117–1124. [CrossRef] [PubMed]
310. Osanai, M.; Nishikiori, N.; Murata, M.; Chiba, H.; Kojima, T.; Sawada, N. Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: Role of retinoic acid receptor α agonists in colitis. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 250–258. [CrossRef]
311. Kubota, H.; Chiba, H.; Takakuwa, Y.; Osanai, M.; Tobioka, H.; Kohama, G.I.; Mori, M.; Sawada, N. Retinoid X receptor α and retinoic acid receptor γ mediate expression of genes encoding tight-junction proteins and barrier function in F9 cells during visceral endodermal differentiation. *Exp. Cell Res.* **2001**, *263*, 163–172. [CrossRef]
312. Grizotte-Lake, M.; Zhong, G.; Duncan, K.; Kirkwood, J.; Iyer, N.; Smolenski, I.; Isoherranen, N.; Vaishnav, S. Commensals Suppress Intestinal Epithelial Cell Retinoic Acid Synthesis to Regulate Interleukin-22 Activity and Prevent Microbial Dysbiosis. *Immunity* **2018**, *49*, 1103–1115.e6. [CrossRef] [PubMed]
313. Ismail, A.S.; Valastyan, J.S.; Bassler, B.L. A Host-Produced Autoinducer-2 Mimic Activates Bacterial Quorum Sensing. *Cell Host Microbe* **2016**, *19*, 470–480. [CrossRef] [PubMed]
314. Perez de Souza, L.; Alseekh, S.; Scossa, F.; Fernie, A.R. Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry variants for metabolomics research. *Nat. Methods* **2021**, *1*–14. [CrossRef]
315. Da Silva, R.R.; Dorrestein, P.C.; Quinn, R.A. Illuminating the dark matter in metabolomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 12549–12550. [CrossRef]
316. Jarmusch, A.K.; Wang, M.; Aceves, C.M.; Advani, R.S.; Aguirre, S.; Aksenov, A.A.; Aleti, G.; Aron, A.T.; Bauermeister, A.; Bolledu, S.; et al. ReDU: A framework to find and reanalyze public mass spectrometry data. *Nat. Methods* **2020**, *17*, 901–904. [CrossRef]
317. Nothias, L.F.; Petras, D.; Schmid, R.; Dührkop, K.; Rainer, J.; Sarvepalli, A.; Protasyuk, I.; Ernst, M.; Tsugawa, H.; Fleischauer, M.; et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat. Methods* **2020**, *17*, 905–908. [CrossRef]
318. Dührkop, K.; Fleischauer, M.; Ludwig, M.; Aksenov, A.A.; Melnik, A.V.; Meusel, M.; Dorrestein, P.C.; Rousu, J.; Böcker, S. SIRIUS 4: A rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat. Methods* **2019**, *16*, 299–302. [CrossRef] [PubMed]
319. Schmid, R.; Petras, D.; Nothias, L.F.; Wang, M.; Aron, A.T.; Jagels, A.; Tsugawa, H.; Rainer, J.; Garcia-Aloy, M.; Dührkop, K.; et al. Ion identity molecular networking in the GNPS environment. *bioRxiv* **2020**. [CrossRef]
320. Shahaf, N.; Rogachev, I.; Heinig, U.; Meir, S.; Malitsky, S.; Battat, M.; Wyner, H.; Zheng, S.; Wehrens, R.; Aharoni, A. The WEIZMASS spectral library for high-confidence metabolite identification. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–13. [CrossRef]
321. Vinaixa, M.; Schymanski, E.L.; Neumann, S.; Navarro, M.; Salek, R.M.; Yanes, O. Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC-Trends Anal. Chem.* **2016**, *78*, 23–35. [CrossRef]
322. Wishart, D.S.; Jewison, T.; Guo, A.C.; Wilson, M.; Knox, C.; Liu, Y.; Djoumbou, Y.; Mandal, R.; Aziat, F.; Dong, E.; et al. HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*. [CrossRef]
323. NIST20: Updates to the NIST Tandem and Electron Ionization Spectral Libraries|NIST. Available online: <https://www.nist.gov/programs-projects/nist20-updates-nist-tandem-and-electron-ionization-spectral-libraries> (accessed on 14 May 2021).
324. Smith, C.A.; O’Maille, G.; Want, E.J.; Qin, C.; Trauger, S.A.; Brandon, T.R.; Custodio, D.E.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. METLIN: A metabolite mass spectral database. *Ther. Drug Monit.* **2005**, *27*, 747–751. [CrossRef] [PubMed]
325. Advanced Mass Spectral Database—mzCloud. Available online: <https://www.mzcloud.org/> (accessed on 14 May 2021).
326. Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; et al. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 703–714. [CrossRef]
327. Sawada, Y.; Nakabayashi, R.; Yamada, Y.; Suzuki, M.; Sato, M.; Sakata, A.; Akiyama, K.; Sakurai, T.; Matsuda, F.; Aoki, T.; et al. RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: A plant-specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry* **2012**, *82*, 38–45. [CrossRef]
328. Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D.; Watrous, J.; Kapon, C.A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837. [CrossRef]
329. Quinn, T.P.; Erb, I. Examining microbe–metabolite correlations by linear methods. *Nat. Methods* **2021**, *18*, 37–39. [CrossRef] [PubMed]
330. Morton, J.T.; Aksenov, A.A.; Nothias, L.F.; Foulds, J.R.; Quinn, R.A.; Badri, M.H.; Swenson, T.L.; Van Goethem, M.W.; Northen, T.R.; Vazquez-Baeza, Y.; et al. Learning representations of microbe–metabolite interactions. *Nat. Methods* **2019**, *16*, 1306–1314. [CrossRef] [PubMed]

331. Morton, J.T.; McDonald, D.; Aksenov, A.A.; Nothias, L.F.; Foulds, J.R.; Quinn, R.A.; Badri, M.H.; Swenson, T.L.; Van Goethem, M.W.; Northen, T.R.; et al. Reply to: Examining microbe–metabolite correlations by linear methods. *Nat. Methods* **2021**, *18*, 40–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
332. Rosshart, S.P.; Herz, J.; Vassallo, B.G.; Hunter, A.; Wall, M.K.; Badger, J.H.; McCulloch, J.A.; Anastasakis, D.G.; Sarshad, A.A.; Leonardi, I.; et al. Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses. *Science* **2019**, *365*. [[CrossRef](#)]
333. Cassotta, M.; Forbes-Hernández, T.Y.; Iglesias, R.C.; Ruiz, R.; Zabaleta, M.E.; Giampieri, F.; Battino, M. Links between nutrition, infectious diseases, and microbiota: Emerging technologies and opportunities for human-focused research. *Nutrients* **2020**, *12*, 1827. [[CrossRef](#)]
334. Venema, K.; Van Den Abbeele, P. Experimental models of the gut microbiome. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2013**, *27*, 115–126. [[CrossRef](#)]
335. Marzorati, M.; Van De Wiele, T. An Advanced in Vitro Technology Platform to Study the Mechanism of Action of Prebiotics and Probiotics in the Gastrointestinal Tract. *J. Clin. Gastroenterol.* **2016**, *50*, S124–S125. [[CrossRef](#)]
336. Rinschen, M.M.; Ivanisevic, J.; Giera, M.; Siuzdak, G. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 353–367. [[CrossRef](#)]

III. Modèle d'étude des immunométabolites bactériens - infection chronique par *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose

La production des immunométabolites a beaucoup moins été étudiée dans un contexte infectieux. Il a cependant été montré que les bactéries pathogènes avaient également la capacité de moduler les réponses immunitaires de l'hôte²⁵⁻³². De plus, l'étude conduite par O. Moyne au cours de sa thèse effectuée au sein du laboratoire a montré que des souches de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) présentaient un endométabolome différent en fonction de leur virulence³³. Des métabolites de la voie des polyamines ont été mis en évidence dans les variations observées. Ces métabolites ont été décrits pour les propriétés immunomodulatrices comme cela a été présenté dans la revue³⁴. La capacité des bactéries à excréter les métabolites dans le milieu environnant ainsi que leur impact sur le système immunitaire dans ce contexte est mal connu.

1. Modèle d'infection chronique pour l'évaluation de la modulation du système immunitaire induite par la bactérie

L'adaptation des bactéries à son hôte, en l'occurrence ici l'homme, s'observe dans deux contextes : le microbiote et les infections chroniques. Dans un contexte pathologique, la bactérie va devoir s'adapter aux pressions exercées aussi bien par le système immunitaire que par les antibiotiques pour pouvoir persister chez l'hôte. La persistance est définie par la capacité des bactéries à résister chez le patient, même lors de l'administration de hautes doses d'antibiotiques, sans que des résistances à ces traitements ne soient identifiées³⁵. Différents mécanismes d'adaptation ont été décrits comme la formation de biofilms, la diminution voire l'arrêt de la croissance bactérienne ainsi que la diminution de l'immunogénicité de la bactérie pouvant aller jusqu'à l'induction d'une immunosuppression^{35,36}. Cependant, ils restent insuffisamment compris actuellement et d'autres mécanismes restent à élucider. La production de métabolites immunomodulateurs par les bactéries constitue un moyen d'interaction avec l'hôte, comme nous l'avons présenté au cours de l'introduction. Celui-ci est peu étudié dans le cadre des infections par des espèces pathogènes. Les infections pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose constituent un modèle d'étude idéal puisqu'il s'agit actuellement de la seule pathologie dans laquelle les infections ont fait émerger la notion de « microbiote » comprenant ces espèces pathogènes³⁷. Les infections puis les colonisations successives sont à l'origine du développement d'un nouvel écosystème pulmonaire, favorisé par un environnement inflammatoire et la prise d'antibiothérapie à répétition³⁸. Différents pathogènes sont fréquemment retrouvés chez ces patients mais le germe majoritaire à l'âge adulte est *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). C'est une bactérie qui a

une forte capacité d'adaptation notamment au niveau métabolique, constituant un modèle d'autant plus intéressant pour l'étude des immunométabolites en contexte pathologique³⁹.

Dans la suite de l'introduction, nous nous intéresseront à l'interaction entre Pa et l'immunité dans le modèle d'étude de la mucoviscidose.

2. La mucoviscidose

➤ 2.1. Physiopathologie de la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique dans laquelle le gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) est muté. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive, la maladie ne s'exprime alors que chez les personnes ayant une mutation homozygote. Les personnes porteuses d'un seul des deux allèles sont alors dit « conductrices » puisqu'elles ne sont pas malades mais peuvent transmettre la maladie. L'allèle muté est retrouvé fréquemment dans la population générale, chez une personne sur 25⁴⁰. Cette fréquence dépend de l'origine géographique et ethnique. De nombreuses mutations ont été décrites, environ 2000 actuellement, dont 242 conduisent à l'apparition de la mucoviscidose⁴¹. La mutation prédominante est la $\Delta f508$ qui correspond à la délétion de trois nucléotides responsables de la disparition de la phénylalanine en position 508⁴⁰.

Le gène CFTR code pour la protéine CFTR, un canal appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) qui permet le transport des ions de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule⁴². Les mutations de ce gène vont avoir différentes conséquences sur la protéine, réparties en différentes classes allant de I à VI⁴³. Elles peuvent entraîner une diminution de la présence de la protéine au niveau de la membrane plasmique (dû à un défaut de synthèse ou à un défaut de transport) ainsi qu'à la production d'une protéine non fonctionnelle⁴⁰.

Le principal ion transporté par ce canal est le chlore, mais il régule de nombreux courants ioniques transmembranaire. L'accumulation d'ion chlorure au niveau extracellulaire entraîne une sortie de sodium. Ces deux ions sont responsables d'une augmentation de la pression osmotique qui s'accompagne d'une sortie d'eau. La diminution de la concentration en chlore au niveau extracellulaire a pour conséquence la diminution de la concentration en eau et entraîne un phénomène d'épaississement des différents mucus et l'apparition des symptômes observés chez les patients atteints de mucoviscidose. Le défaut de transport des différents ions est également responsable d'une variation du pH extracellulaire diminuant l'efficacité des défenses immunitaires qu'elles soient cellulaires ou médiées par des peptides anti-microbiens comme le LL-37⁴⁴.

➤ 2.2. *Epidémiologie de la mucoviscidose*

La mucoviscidose est une maladie rare, c'est-à-dire qu'elle touche moins d'une personne sur 2000 selon la définition de l'OMS de 1966. Sur la population française, cela correspond à un seuil de 30 000 personnes. La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies rares⁴⁵. La proportion de personnes atteintes varie dans le pays allant d'un patient sur 2500 dans le nord à un patient sur 10000 dans le sud. La prévalence de cette maladie en France est de 7280 en 2019⁴⁶. L'espérance de vie à la naissance s'est beaucoup améliorée ces dernières années et a atteint les 50ans, même si la médiane d'âge au décès est encore de 34,7ans⁴⁶. Les patients ont un âge moyen de 23,4 ans. Si de nombreuses améliorations ont eu lieu, notamment concernant la prise en charge, une évolution défavorable des infections (tous germes confondus) est observée⁴⁶.

➤ 2.3. *Approche diagnostique de la maladie*

La mucoviscidose peut être suspectée au stade anténatal sur des signes d'appel échographique montrant une dilatation digestive ou une hyperéchogénicité intestinale. Une recherche des principales mutations pourra alors être réalisée chez les parents. Si celle-ci est positive, le diagnostic est établi sur une amniocentèse. La mucoviscidose fait partie des 5 maladies à dépistage néonatal obligatoire. Il est réalisé à partir du test de Guthrie par deux techniques au 3^{ème} jour de vie. En première intention il s'agit d'une mesure de la trypsine immunoréactive et de la protéine associée à la pancréatite, si ces marqueurs sont positifs, une recherche des 36 mutations les plus fréquentes est réalisée par biologie moléculaire. Si une ou deux mutations sont détectées, un test à la sueur est réalisé pour affirmer que le patient est atteint. Si ces résultats sont négatifs mais que la pathologie est fortement suspectée le séquençage complet du gène CFTR est effectué.

➤ 2.4. *Symptomatologie et prise en charge de la maladie*

La symptomatologie de la maladie est très variable, avec une pénétrance incomplète. Les symptômes peuvent apparaître de la naissance jusqu'à l'âge adulte pour les cas les moins sévères. Celle-ci est dû à une anomalie du transport de l'eau dans le milieu extérieur, occasionnant un épaissement du mucus inhibant la clairance muco-ciliaire. Différents types d'atteintes ont été décrits, impliquant tous les organes présentant des épithéliums sécrétoires. Les atteintes majoritaires sont retrouvées au niveau pulmonaire et intestinal, mais touchent également la sphère ORL et peuvent entraîner une infertilité⁴⁷. L'atteinte pulmonaire est la plus préoccupante puisqu'elle engage le pronostic vital. Les patients souffriront alors de bronchite chronique obstructive et insuffisance respiratoire. De plus, le mucus épaissi constitue un environnement propice à la prolifération bactérienne. Les patients souffriront d'infections respiratoires aiguës puis chroniques lors du développement de bactéries capables de persister chez l'hôte⁴⁸. Les symptômes associés à ces

infections respiratoires chroniques sont une accentuation des expectorations, de la toux, un essoufflement pouvant conduire à une hypoxie chronique et à l'apparition d'hémoptysies⁴⁹. Les atteintes respiratoires sont ainsi responsables de 80% des décès des patients n'ayant pas reçu de greffe pulmonaire⁵⁰. Une polymédication est mise en place chez les patients pour pallier l'ensemble des symptômes. Au niveau pulmonaire les traitements recommandés par le Programme National de Soins (PNDS) de 2017, ont pour objectifs de :

- Diminuer l'inflammation : principalement des corticoïdes (inhalés ou par voie orale), mais également l'Azithromycine, un antibiotique qui permet de lutter contre Pa mais qui présente également une activité anti-inflammatoire.
- De fluidifier les sécrétions bronchiques : des mucolytiques et la dornase alpha, une enzyme permettant de dégrader l'ADN présent dans le mucus et qui est à l'origine d'un épaissement. Cet ADN est issu des leucocytes mobilisés pour lutter contre les infections qui s'accumulent et entrent en dégénérescence.
- D'améliorer la dyspnée par des traitements ayant un effet bronchodilatateur.
- De prendre en charge les infections, dépend du germe identifié au cours de l'ECBC (examen cyto-bactériologique des crachats).

L'ensemble des traitements décrits auparavant permettent uniquement une prise en charge symptomatique. Cependant, de nouveaux traitements ont été développés visant à améliorer le fonctionnement du canal CFTR, que ce soit en augmentant son transport à la membrane ou en augmentant l'ouverture du canal. Trois molécules sont actuellement utilisées en clinique et leur association sous forme de trithérapie constitue une avancée majeure dans la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose. Enfin, le traitement de dernière intention est la greffe pulmonaire, proposée aux patients en insuffisance respiratoire majeure prenant en compte la valeur du VEMS (avec un seuil à 30%), la cinétique d'évolution de la fonction respiratoire (dégradation rapide), la fréquence des exacerbations, la présence d'hémoptysies répétées / abondantes ou de pneumothorax répétées ou compliqués.

➤ 2.5. *Suivi des fonctions respiratoires et exacerbations*

Le suivi des patients atteints de mucoviscidose est effectué de façon multidisciplinaire, en ville et à l'hôpital, et coordonné par un CRCM : Centre des Ressources et des Compétences sur la Mucoviscidose.

L'évaluation de la fonction respiratoire (EFR) permet de suivre l'évolution de la pathologie par l'analyse des volumes pulmonaires, qui représentent les propriétés du parenchyme pulmonaire, de la cage thoracique et des muscles respiratoires, des débits bronchiques et des échanges gazeux⁵¹. En fonction des résultats obtenus au cours de ces examens, différents types de troubles respiratoires

sont définis : obstructifs, restrictifs et mixtes. Les troubles ventilatoires obstructif (TVO) sont des anomalies des débits respiratoires et sont définis par la diminution du calibre des bronches. C'est dans ces troubles que l'on classe également la mucoviscidose, qui sont dû à une accumulation de mucus. Les volumes pulmonaires et les débits bronchiques sont évalués par spirométrie ou pléthysmographie. Ces techniques consistent à analyser les volumes d'air inspirés et expirés lors de différentes manœuvres respiratoires définissant les volumes détaillés si après (figure 7) : le Volume Courant (VT), volume d'air inspiré et expiré au cours d'un cycle respiratoire classique, la Capacité Vitale Fonctionnelle (CVF) : association du VT, et des volumes de réserve inspiratoire et expiratoire (VRI et VRE). Enfin le VEMS ou Volume Expiratoire Maximale Seconde est l'examen le plus utilisé pour l'évaluation des TVO. L'évaluation du rapport VEMS/CV est appelé rapport de Tiffeneau. Il permet de définir un TVO à partir d'un rapport inférieur à 0,7. L'évolution de la fonction respiratoire après administration de β_2 mimétique tels que le Salbutamol permet d'investiguer l'aspect « réversible » de l'obstruction est également évalué chez les patients atteints de mucoviscidose

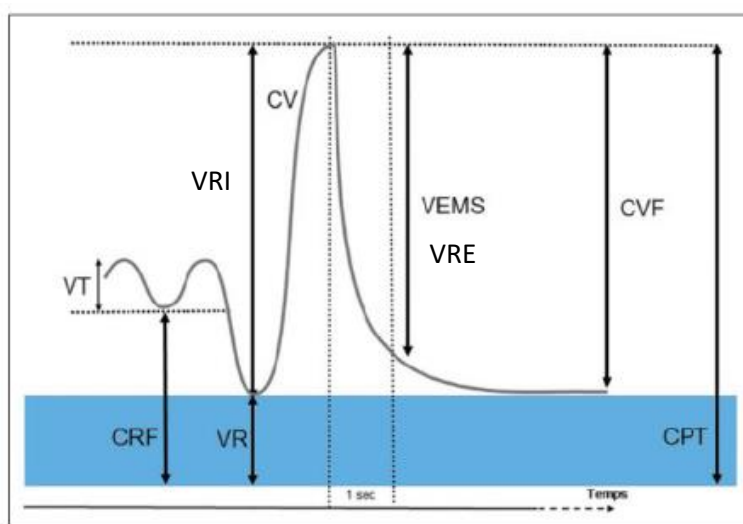


Figure 7 - Présentation des volumes pulmonaires par spirométrie et pléthysmographie (adapté de Pierre-Olivier Bridevaux PO., 2018)

De l'ensemble de ces examens, celui qui reflète le mieux l'évolution des fonctions respiratoires dans la mucoviscidose est le VEMS. Il est exprimé en pourcentage de la valeur moyenne obtenue chez les personnes saines de même sexe, âge et taille. C'est également un marqueur prédictif de la mortalité puisque d'après le modèle publié par Kerem E. et al., les patients dont le VEMS est inférieur à 30% ont 50% de risque de décéder dans les deux ans⁵². Il s'agit donc également d'un critère pour orienter le patient vers la greffe pulmonaire^{53,54}

La fonction respiratoire des patients évolue au cours du temps. Si dans les années 90 celle-ci ne faisait que diminuer avec l'âge, nous observons depuis les années 2000 une certaine stabilisation

à partir de la tranche d'âge comprise entre 20 et 24ans (Figure 8)⁵⁵. Cette évolution n'est pas linéaire au cours du temps, celle-ci peut être entrecoupé par des diminutions rapides et marquées que sont les exacerbations⁵⁶. Lors de leur résolution, le patient peut retrouver sa fonction respiratoire antérieure, mais ceci n'est pas systématique et des dommages peuvent persister et participer au déclin que l'on observe au cours du temps. Les exacerbations sont difficiles à diagnostiquer car elles sont définies par de nombreux critères : une augmentation de la toux, du volume et de la purulence des crachats, de l'asthme ou de la gêne respiratoire. Une altération de l'état général est également un critère diagnostic et peut accompagner les symptômes précédemment décrits avec de l'anorexie/perte de poids, asthénie, une diminution de l'activité et éventuellement de la fièvre ⁵⁷.

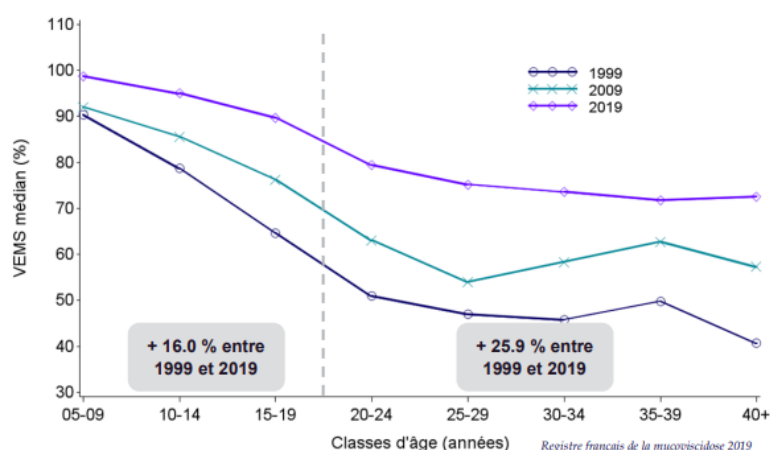


Figure 8 - Représentation de l'évolution du VEMS en fonction de l'âge des patients, en 1992, 2003 et 2014. Si une diminution du VEMS est observée entre 5 et 19ans, une stabilisation voir une amélioration est observée pour les patients au-delà de 20ans (registre français de la mucoviscidose, 2019).

Les exacerbations sont majoritairement causées par les bactéries pathogènes infectant les patients atteints de mucoviscidose. Les prélèvements négatifs représentent 17% des cas. Les bactéries isolées dépendent de l'âge du patient. Folkesson A. et son équipe ont montrés que les patients étaient majoritairement infectés par *Staphylococcus aureus* (Sa) et *Haemophilus Influenzae* pendant leur enfance, puis par Pa à l'âge adulte (Figure 9)⁵⁸. Le deuxième germe retrouvé chez les patients adulte reste Sa, et de façon plus accessoire *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans*. *Burkholderia cepacia* est en réalité un complexe bactérien constitué d'une vingtaine d'espèces dont un des sous-types est particulièrement recherché : *cenocepacia*, qui peut entraîner des pneumonies nécrosantes responsables du décès des patients par septicémie, appelé « syndrome cepacia »^{59,60}.

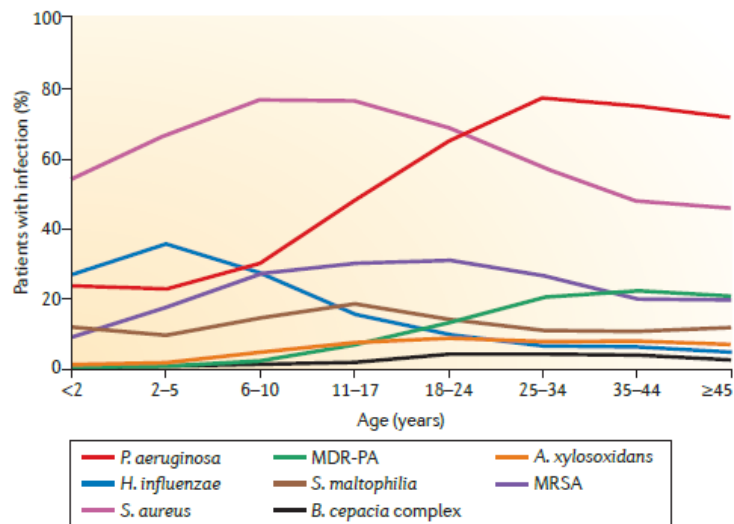


Figure 9 - Evolution du type de germes infectant les patients atteints de mucoviscidose en fonction de leur âge (Folkesson et al., 2012)

3. Le pathogène majoritaire : *Pseudomonas aeruginosa*

Pa est le germe le plus fréquemment retrouvé chez les patients atteints de mucoviscidose. Le développement d'une infection chronique est à l'origine de 75% des décès observés chez ces patients⁶¹. *Pa* est également responsable de nombreuses infections nosocomiales, il est le 4^{ème} germe le plus fréquent dans les hôpitaux français en 2018⁶². Mais c'est surtout l'augmentation des souches de *Pa* multirésistantes qui en a fait un pathogène prioritaire, classé comme critique, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2017. *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste, c'est-à-dire qu'il peut entraîner des infections chez les sujets immunodéprimés ou présentant des comorbidités. En plus des patients atteints de mucoviscidose, il est retrouvé au niveau des plaies cutanées, chez les patients grands brûlés, atteints de bronchopneumopathies chroniques, ou chez les patients âgés, mais il concerne également les infections sur matériel. Les différentes localisations sont présentées sur le tableau I.

Tableau I : Différentes types d'infections dues à *Pa*

Localisation		Symptômes
Cutanée		Infections de plaies cutanées chroniques ou ulcères entraînant une nécrose cutanée avec pus bleuté.
Respiratoires	ORL	Otite externe simple ou compliquée chez le sujet à risque Sinusite
	Pneumopathies	Ventilation mécanique avec incubation trachéale de plus de 48h
Urinaires		Associée ou favorisée par la présence de matériel ou d'un obstacle à l'évacuation
Bactériémie		Secondaires aux infections détaillées préalablement
Méningite		Consécutive à une infection ORL par contiguïté à un traumatisme crânien une bactériémie ou une intervention chirurgicale

Pa, aussi appelé bacille pyocyanique, est la principale représentante des bactéries du genre *Pseudomonas*. Elle tient son nom de sa capacité à produire des pigments de couleur bleu ou verte : la pyocyanine et la pyoverdine. C'est un bacille de 0,5µm sur 1,5µm, gram négatif, c'est-à-dire qu'elle présente une paroi constituée d'une membrane interne et d'une membrane externe, au milieu desquelles se trouve l'espace périplasmique contenant le peptidoglycane (figure 10)⁶³.

➤ 3.1. Diagnostique microbiologique :

L'examen bactériologique est réalisé sur les crachats ou les expectorats (ECBC). L'observation de l'aspect macroscopique permet d'évaluer si le prélèvement est limpide ou trouble, l'aspect trouble pouvant être lié à la présence de leucocytes (le plus fréquent) ou de bactéries en grande quantité ou si le prélèvement contient des hématies. La seconde étape est un examen direct dont l'objectif est de déterminer le type de bactéries présentes dans l'échantillon afin d'orienter le clinicien sur les traitements à initier. Pour cela, une coloration de Gram est réalisée afin de mettre en évidence la présence de bactéries puis de donner leur type : bacille ou cocci et Gram positif ou Gram négatif. La coloration de Gram consiste à appliquer du cristal violet, colorant toutes les bactéries en violet puis les bactéries Gram négatives possédant une paroi moins riche en peptidoglycane sont décolorées à l'éthanol et colorées à la Safranine de couleur rose, les rendant de nouveaux visibles et différenciables au microscope.

La dernière étape consiste à mettre en culture le prélèvement. Pa est une bactérie non exigeante cultivée sur milieu ordinaire et sur des milieux spécifiques tels que la gélose au sang cuit, et la gélose au Cétrimide, respectivement. Des milieux peuvent également être utilisés en cas de prélèvements polymicrobiens afin de sélectionner les bactéries Gram négatives, tels que le milieu Digralski. La lecture se fait après 24h de culture à 37°C et un antibiogramme est réalisé automatiquement. Pa forme généralement des colonies plates à bords irréguliers. Les formes mucoïdes sont signalées systématiquement. Les colonies dégagent une odeur caractéristique de fleur de seringas. La production de pigments peut également être évaluée sur milieux :

- King A : favorise la production de pyocyanine
- King B : favorise la production de pyoverdine.

Ces milieux ne sont actuellement plus utilisés, l'identification formelle se fait actuellement par spectrométrie de masse, MALDI-TOF.

➤ 3.2. Prise en charge des infections à Pa chez les patients atteints de mucoviscidose

Lorsque le diagnostic d'infection à Pa est établi, le patient est pris en charge selon la conférence de consensus de 2002⁶⁴. La colonisation par le pyo entraîne des effets très délétères pour le patient, l'antibiothérapie vise dans un premier temps à retarder le plus possible la primo-colonisation. Lorsque l'infection chronique est établie, les antibiotiques vont fortement perdre de leur effet, notamment par l'établissement d'un biofilm. Il est suggéré que leur efficacité à partir de l'instauration de la chronicité, serait plus liée à une diminution de la production des facteurs de virulence, qu'à une diminution de l'inoculum bactérien⁶⁴.

La prise en charge de la primo-infection repose sur un traitement par l'association de 2 antibiotiques bactéricides : un représentant des bêta-lactamine et des aminosides par voie IV pendant 14 à 21 jours, suivis ou non d'aérosols de colistine pendant 3 à 6 mois. L'aminoside le plus utilisé est la tobramycine en dose unique journalière de moindre toxicité⁶⁴.

La prise en charge du traitement de fond de l'infection chronique repose sur un traitement d'entretien par les antibiotiques inhalés, notamment la tobramycine, alternant 1 mois de traitement et 1 mois sans traitement. Des signes minimes d'aggravation clinique ou fonctionnelle respiratoire doivent faire recourir à une cure IV d'antibiotiques. Les cures systématiques IV trimestrielles sont une alternative intéressante en termes d'efficacité. Le recours à la ciprofloxacine per os en intercure peut être envisagé lorsque les cures IV se répètent. Les macrolides, dont l'azithromycine, sont une alternative dans le traitement de l'infection chronique du fait de leur action sur les facteurs de virulence de PA, de leur activité anti-inflammatoire et d'une action possible sur CFTR. La poursuite du traitement doit être réévaluée à 3 mois. Le traitement des exacerbations est réalisé par voie IV par un antibiotique choisi en fonction du dernier antibiogramme et des réponses thérapeutiques antérieures. La sélection des bêtalactamines est initiée par les carboxypénicillines, puis les uréidopénicillines, les céphalosporines, et les « penems ». Une bithérapie avec la tobramycine permet d'éviter l'émergence de souches résistantes. En cas de souches multirésistantes, la ciprofloxacine per os est proposé en complément. La colistine par voie IV reste un choix possible dans cette situation⁶⁴.

Etant donné la variabilité des protocoles, il est important de prendre en compte les antibiothérapies prises par le patient ainsi que leur fréquence pour expliquer les différents phénotypes de souches observés chez les patients. Il a en effet été mis en évidence que le métabolome des souches était corrélé avec l'antibiorésistance³³. De plus Murphy BS. et son équipe ont montré que l'immunité induite contre les souches pouvait être modulée par la prise d'un traitement antibiotique présentant également des propriétés anti-inflammatoire qu'est l'azithromycine. En effet, il a été montré *in vitro* que l'azithromycine entraîne une polarisation des

macrophages vers un phénotype M2 et les patients atteints de mucoviscidose ont une proportion plus importante de macrophages de type M2, ils ont ainsi émis l'hypothèse que le traitement puisse être à l'origine de cette immunomodulation⁶⁵.

➤ 3.3. Description des facteurs de virulence, en regard du système immunitaire

L'ensemble des facteurs de virulence sont présentés sur la figure 10 et son repris dans les parties suivantes.

▪ 3.3.1. Le lipopolysaccharide (LPS)

La membrane externe des bactéries Gram négatif est tapissée de LPS, qui a notamment pour rôle de stabiliser la paroi bactérienne. C'est une endotoxine, à opposer aux exotoxines produites et excrétées par Pa et elle constitue un antigène reconnaissable par les cellules immunitaires et notamment les CD. La structure du LPS se décompose en 3 parties⁶⁶⁻⁶⁸ :

- L'antigène O : constituée de 1 à 8 sucres est la partie la plus variable pouvant conférer un avantage à chaque clone bactérien. Il bloque également l'accès du système immunitaire au lipide A et à la partie centrale.
- Le « noyau ou cœur » oligosaccharidique, beaucoup plus conservé, constitué également de sucres avec une partie externe et une partie interne faisant le lien entre les deux autres parties.
- Le lipide A est également constitué de sucres et décoré d'acide gras permettant son ancrage à la membrane externe. C'est la partie qui est responsable du développement de la réponse pro-inflammatoire en tant que ligand du TLR4. Lors de la lyse bactérienne, il est relargué entraînant une réponse inflammatoire majeure et dramatique pour l'hôte, qui explique cette appellation « d'endotoxine ».

Il a été mis en évidence par Shin et son équipe que le LPS de Pa pouvait induire une régulation positive de l'expression du TLR2, notamment impliqué dans la réponse immunitaire dirigé contre les bactéries Gram positive et notamment *Staphylococcus aureus* permettant à Pa de lutter contre les autres pathogènes infectant les poumons des patients atteints de mucoviscidose⁶⁹.

▪ 3.3.2. Facteurs de mobilité et d'adhésion aux cellules

Pa est capable de s'attacher à différentes surfaces, mais également à d'autres bactéries participant à la constitution des biofilms et aux cellules de l'hôte.

▪ 3.3.2.1. Le Flagelle

Pa est une bactérie mobile grâce à la présence d'un flagelle polaire, que l'on appelle également ciliature monotriche. Le flagelle permet une mobilité de type « swimming » mais également « swarming » qui correspondent respectivement à une mobilité isolée dans un environnement aqueux ou associé à d'autres bactéries, en « raft », au sein des sécrétions pulmonaires par exemple⁷⁰. C'est un facteur de virulence majeur pour la bactérie, puisqu'il lui confère ses propriétés invasives mais également la possibilité de croître en biofilm puisqu'il est nécessaire au cours de la première phase qui est l'adhésion sur les surfaces^{71,72}. En plus des surfaces, il permet à la bactérie d'adhérer aux cellules épithéliales pulmonaires, entraînant la production d'IL-8⁷³. Le flagelle est composé de flagelline, protéines fortement immunogènes et reconnues par le TLR-5 et plus accessoirement par le TLR-2, permettant la reconnaissance et la clairance bactérienne par les macrophages^{74,75}.

▪ 3.3.2.2. Le Pili de type IV

Cette structure participe également à la mobilité et à l'adhésion de Pa. C'est une des principales adhésine de Pa permettant, tout comme le flagelle, l'adhésion aux surfaces mais également l'adhésion avec les autres bactéries et les cellules épithéliales pulmonaires⁷⁶. Le pili de type IV est également nécessaire à la constitution du biofilm dans une moindre mesure que celle décrite pour le flagelle⁷². Son implication dans la reconnaissance et l'interaction avec le système immunitaire est peu décrite, notamment chez Pa. Tan RM. et son équipe ont cependant mis en évidence qu'il pouvait conférer une résistance à la bactérie contre la protéine A présente dans le surfactant pulmonaire, empêchant l'opsonisation et la clairance par les macrophages⁷⁷. Les mutants dépourvus de pili de type IV présentaient une virulence diminuée dans un modèle murin d'infection pulmonaire⁷⁷.

▪ 3.3.3. Facteurs d'invasion

Pa sécrète un certain nombre de molécules contribuant à sa virulence, en lui permettant d'interagir avec l'environnement pour pouvoir s'implanter mais également de se défendre contre toutes les attaques extérieures qu'elles soient cellulaires ou médiées par des protéines.

▪ 3.3.3.1. Protéase alcaline

La protéase alcaline est une enzyme, une métalloprotéase à zinc. Elle est excrétée par le système de sécrétion de type (SST) I⁷⁸. La protéase alcaline est capable de dégrader un des composants présents dans la lame basale, la laminine, désorganisant ainsi la structure tissulaire. Elle

est également capable de dégrader des composants impliqués dans la coagulation pouvant entraîner chez le patient des hémoptysies d'importance et de gravité variable⁷⁹.

Elle permet également de lutter contre le système immunitaire par différents mécanismes. Elle empêche la reconnaissance du flagelle par le TLR5 en clivant les monomères de la flagelline alors que la forme polymérique permettant le fonctionnement du flagelle reste intacte⁸⁰. Elle permet également d'inhiber le système du complément en clivant les protéines C1 et C2, lui permettant d'échapper à l'opsonisation^{81,82}. Enfin, La protéase alcaline a également la capacité de cliver des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ produite par les LT mais également le TNF α et l'IL-6^{83,84}. Ceci met en évidence un rôle majeur de cette protéine pour échapper au système immunitaire inné et adaptatif.

▪ 3.3.3.2. Elastases

L'élastase est également une métalloprotéase à zinc. Elle est excrétée par le SSTII. L'élastase représente en réalité deux enzymes LasA, aussi nommée staphylolysine, et LasB, aussi nommée pseudolysine, qui agissent de manière synergique. L'élastase possède également la propriété de dégrader la laminine mais aussi l'élastine et le collagène⁸⁵. L'élastine est une protéine de structure très présente au niveau pulmonaire. Sa dégradation entraîne une perte d'élasticité du tissu pulmonaire, nécessaire à sa fonction⁸⁰. De la même façon que la protéase alcaline, elle clive des facteurs impliqués dans la coagulation. Van der Plas MJA. et son équipe ont en effet montré que l'élastase de Pa était capable de cliver la thrombine la rendant inefficace⁸⁶. Cela permet particulièrement de libérer un peptide C terminal capable de se lier à des éléments comme le LPS, inhibant ainsi leur reconnaissance par le système immunitaire et le développement d'une réponse pro-inflammatoire à l'encontre de Pa⁸⁶. De plus, l'élastase est capable de dégrader des immunoglobulines (Ig) que ce soit des IgA ou des IgG^{87,88}. L'expression de cette enzyme est régulée par des molécules du quorum sensing et notamment par le PQS, qui induit la traduction de *lasb*, notamment durant la phase stationnaire, là où il est le plus produit⁸⁹.

▪ 3.3.3.3. Exotoxine A

Cette toxine excrétée par le SST2 est considérée comme la plus toxique produite par Pa. Elle se fixe au récepteur CD91, plus communément appelé LRP1, présent à la surface de nombreux types cellulaires et notamment des cellules épithéliales et des cellules immunitaires⁹⁰⁻⁹². Après fixation l'exotoxine est internalisée et va pouvoir interagir avec sa cible, le facteur d'élongation eEF-2, entraînant une inhibition de la synthèse protéique et la mort de la cellule par apoptose⁹³.

▪ 3.3.3.4. Exotoxines relarguées par le SST3

Le SST3 est différent des autres systèmes de sécrétion car il permet d'injecter les toxines directement dans le cytoplasme des cellules de l'hôte. Quatre toxines sont excrétées par ce système : ExoU, ExoS, ExoT et ExoY. La plus fréquente étant ExoT et la moins fréquente étant ExoU. ExoS et ExoU sont exclusives l'une de l'autre. Ces exotoxines ne sont actives qu'en présence d'éléments informant la bactérie qu'elle est au contact de cellules eucaryotes⁹⁴.

- ExoU est la toxine la plus délétère pour l'hôte. Elle présente une activité phospholipase A2 capable de détruire la membrane cellulaire. Ceci entraîne une nécrose cellulaire mais également une perméabilité permettant à ExoU de disséminer⁹⁴. Des résultats divergents concernant la capacité d'invasion médiée par cette exotoxine ont été décrits. Il a été montré par Allewet M. et son équipe que la destruction de certains constituants du surfactant pulmonaire facilitait la dissémination des souches bactériennes et le passage au niveau de la circulation systémique⁹⁵. Cependant, une autre étude a mis en évidence que malgré une importante cytotoxicité d'ExoU vis-à-vis de cellules eucaryotes il n'y avait pas d'augmentation de la colonisation par les bactéries produisant cette exotoxine⁹⁶.
- ExoS et ExoT possèdent deux modes d'action distincts : d'un côté elles activent les GTPase et de l'autre elles ont une activité d'ADP-ribosyltransferase⁹⁷. Les deux parties sont impliquées dans la cytotoxicité contre les cellules épithéliales et les macrophages par l'induction de l'apoptose médiée par la voie intrinsèque et dans l'inhibition de la phagocytose de Pa par les macrophages⁹⁷. Il a également été mis en évidence qu'ExoS induisait une puissante activation des monocytes et une réponse pro-inflammatoire lorsque la toxine est relarguée dans le milieu⁹⁸. ExoS est aussi impliquée dans les immunomodulations induites par les souches de Pa par liaison au TLR2 et au TLR4⁹⁸.
- ExoY possède une activité adénylate cyclase qui entraîne la formation d'AMPc au niveau intracellulaire responsable d'une déstructuration de la cellule ainsi que d'une augmentation de la perméabilité de l'endothélium. Enfin elle permet de diminuer la phagocytose par les cellules de l'hôte^{70,99}.

En plus de sa capacité à injecter des exotoxines au sein des cellules de l'hôte, le SST3 est capable d'induire une mort cellulaire des macrophages et des PNN indépendamment la sécrétion d'ExoU¹⁰⁰.

▪ 3.3.4. Sidérophores et pigments

Le fer est un élément essentiel à la survie et à la croissance bactérienne, notamment parce qu'il est impliqué dans le transport et le stockage de l'oxygène, ainsi que dans la chaîne respiratoire, et qu'il constitue un co-facteur pour la synthèse, la transcription et la réparation de l'ADN. La lutte pour ce composé est d'autant plus importante que la biodisponibilité est très faible. Deux sidérophores ont été décrit chez Pa, la pyoverdine et la pyocheline.

- La Pyoverdine : la pyoverdine est un sidérophore et un chromophore de couleur verte. La pyoverdine confère un avantage en collectant le fer libre dans l'environnement mais également en prenant celui qui a été séquestré par la transferrine de l'hôte par exemple¹⁰¹. La pyoverdine est essentielle à la virulence de la souche et permet également de moduler l'expression de certaines toxines comme l'exotoxine A ou l'endoprotéase en plus de la régulation de sa propre expression^{101,102}.
- La Pyocyanine est un chromophore de couleur bleu. Elle présente une activité anti-bactérienne et anti-fongique et présente une forte cytotoxicité contre les cellules eucaryotes et procaryotes. Les aspects en liens avec l'immunité sont approfondis dans la partie IV de la thèse.
- La Pyocheline est également un sidérophore de Pa. Il a été beaucoup moins étudié et caractérisé que la pyoverdine. Cependant, son rôle dans la virulence des souches de Pa a pu être démontré dans un modèle d'infection murin. Il a été mis en évidence que la pyocheline améliorait la croissance de la souche bactérienne mais entraînait également une synergie avec les facteurs de virulence de Pa, augmentant ainsi sa létalité¹⁰³.

▪ 3.3.5. Les molécules du Quorum sensing

Le quorum sensing est un élément de communication majeur entre les bactéries mais présente également d'autres caractéristiques impliquées dans la virulence de la souche. Nous l'avons étudié et présenté dans la revue présentée dans ce manuscrit¹⁰⁴. Le quorum sensing contrôle l'expression de 10% des gènes de la bactérie. Il est alors impliqué dans la formation du biofilm mais également dans la mobilité de la bactérie. Il a la capacité à déclencher la sécrétion coordonnée de facteurs de virulence lorsque la densité bactérienne est importante. Enfin, certaines molécules du quorum sensing sont capables d'induire une réponse pro-inflammatoire par le relargage de cytokines, chimiokines et interférons¹⁰⁵.

3.3.6. La croissance en biofilm

Pa est capable de se développer sous forme planctonique, c'est-à-dire isolées les unes des autres et mobiles, soit sous forme de biofilm. La production de mucus, et donc la croissance en biofilm, est un des facteurs de virulence de *Pa*. C'est un facteur protecteur participant à la diminution de la clairance par le système immunitaire¹⁰⁶. Il a été décrit que la production de mucus par les souches de *Pa* augmente au cours du temps, on parle alors de « transition mucoïde »¹⁰⁷. Les éléments décrits comme liés à cette transition sont la durée de l'infection, la prise d'antibiotiques ou d'aérosols par voie inhalée¹⁰⁷. Le système immunitaire participe également à cette transition mucoïde par la pression exercée par les peptides antimicrobiens ou le stress oxydant^{108–110}. La bactérie peut également ressortir de cet état de biofilm pour aller coloniser d'autres surfaces et d'autres niches¹¹¹. La constitution du biofilm s'organise en différentes étapes au cours desquelles la bactérie, après avoir adhéré à la surface pour former une microcolonie capable d'en produire les différents constituants¹¹¹. Les bactéries ne représentent que 2 à 5% du biofilm¹¹². Le reste est composé de substances polymériques extracellulaires appelés EPS et d'eau représentant la majorité du biofilm¹¹². Les EPS interagissent entre eux par différentes interactions chimiques de forte affinité, responsables de la force de la structure¹¹³. Parmi les EPS, on retrouve l'alginate produit uniquement par les souches mucoïdes de *Pa* qui présentent une mutation sur le gène *mucA*¹¹⁴. Il faut enfin noter que la production des EPS participe à diminuer la clairance muco-ciliaire des bactéries.

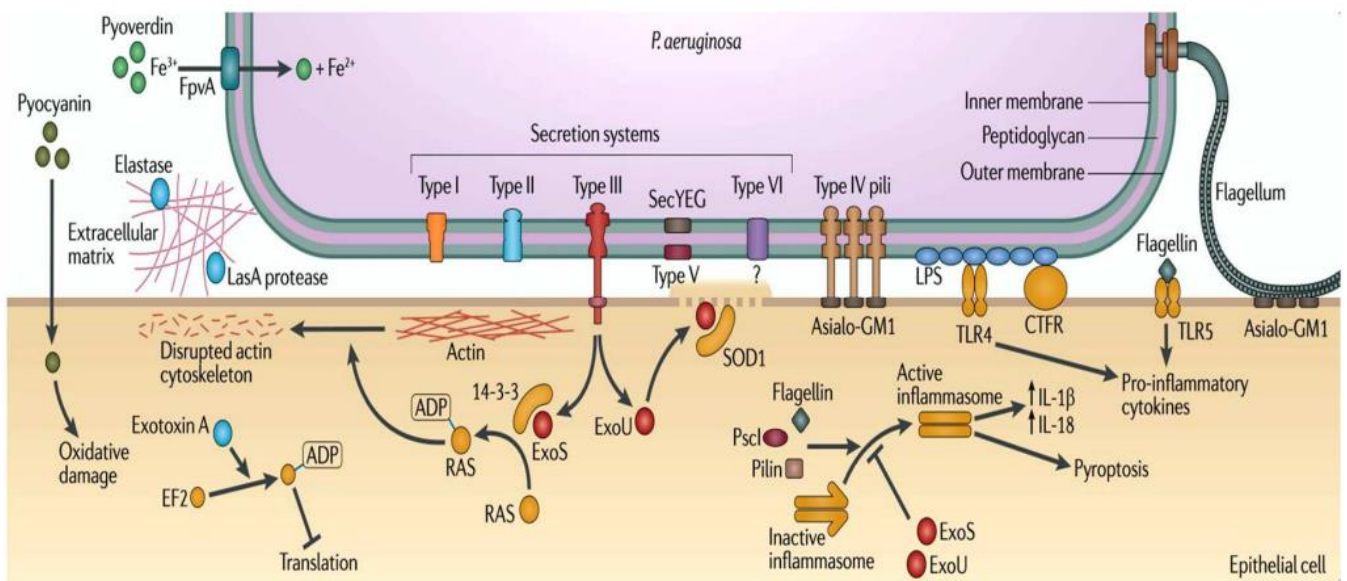


Figure 10 - Récapitulatif des facteurs de virulence de *Pa* (Hauser et al. 2011)

➤ 3.4. Mécanismes d'adaptation chez l'hôte :

L'ensemble des mécanismes d'adaptation sont présentés sur la figure 11. En plus de la production de mucus, d'autres mécanismes d'adaptation ont été décrits pour expliquer la persistance de Pa chez l'hôte. Les souches vont présenter une **croissance ralentie**, ceci diminue leur sensibilité aux antibiotiques mais également leur permet de survivre dans un environnement peu riche en nutriments et en oxygène^{115,116}. Les cellules immunitaires pourraient participer à l'évolution de la vitesse de croissance. Il a été montré par Krag KN. et son équipe que la vitesse de croissance des souches était inversement proportionnelle à la concentration de PNN dans le poumon¹¹⁷. Ceci entraîne un effet bactériostatique et serait médié par la diminution de la concentration en oxygène induite par les PNN. Pa est aussi capable d'adopter un autre phénotype de croissance sous forme de petites colonies, nommées « **Small Colonies Variant** » (SCV). Cette adaptation facilite la persistance de la souche chez l'hôte. Les SCV sont moins sensibles aux antibiotiques et sont associées à une mauvaise réponse clinique, avec une diminution de la CVF ainsi que du VEMS¹¹⁸. Cependant, le mécanisme par lequel cela confère un avantage évolutif à la bactérie est encore mal compris. Deux hypothèses s'opposent¹¹⁹. Il a été décrit que ce phénotype était associé à un mécanisme d'échappement vis-à-vis du système immunitaire et notamment de la réponse innée. Les SCV étaient capables d'induire une glycolyse au sein des cellules de l'hôte qui en synergie avec la production de ROS, entraînait une apoptose cellulaire¹²⁰. Ceci inhibait la capacité du système immunitaire à développer une réponse mémoire efficace. À l'inverse, Pestrack MJ. et son équipe ont montré que l'infection par les SCV entraînait une réponse pro-inflammatoire avec un afflux massif de PNN produisant des cytokines et des ROS responsables de dommages tissulaires au niveau pulmonaire, alors que la souche elle-même présente une résistance augmentée vis-à-vis des ROS ou des peptides antimicrobiens¹¹⁹. Ce phénotype est réversible permettant à la bactérie de retrouver sa capacité à retrouver sa virulence pour s'expandre¹²¹.

La bactérie va également perdre l'expression de certains de ses facteurs de virulence, comme son **flagelle** et donc sa mobilité. La perte de l'expression du flagelle permet à la bactérie de diminuer le développement d'une réponse pro-inflammatoire à son encontre, puisque la flagelline est un TLR ligand reconnue par le TLR5¹²². Cela lui permet également d'échapper à la phagocytose. Il a été montré que les souches de Pa dépourvues de flagelle, de pili et d'adhésine diminuaient leur adhésion aux macrophages et aux PNN mais également que le flagelle était nécessaire au cours de l'internalisation dans les vésicules d'endocytose¹²³. La bactérie présente également des modifications au niveau du **LPS**, que ce soit par la perte de l'expression de l'antigène O, ou par une variation de l'acétylation du lipide A¹²². L'acétylation affecte la reconnaissance du LPS par le TLR4, ainsi que dans le développement d'une réponse immunitaire pro-inflammatoire^{122,124}. Les modifications observées permettraient à la bactérie d'échapper au système immunitaire. Une perte

de l'expression du **SST3** a également été mise en évidence par de nombreuses études. Si les souches environnementales de *Pa* présentent un SST3 actif dans 90% des cas, celui-ci n'est retrouvé que dans 4 à 12% des isolats collectés chez les patients adultes infectés au long cours¹²². Cela suggère qu'il est nécessaire pour lutter contre les cellules du système immunitaire au cours de la phase aiguë de l'infection. Par la suite, cela est délétère pour la bactérie puisque le système immunitaire est capable de développer des anticorps contre les protéines du SST3, facilitant sa clairance¹²⁵. La perte de la capacité à produire un SST3 passe par une diminution de l'expression d'ExsA, un facteur de transcription nécessaire à l'obtention d'un SST3 fonctionnel¹²⁶. La production et l'injection de **toxines** diminuent également l'établissement de la chronicité¹²⁷. Une diminution de la production d'ExoU notamment a été observée, toxine la plus virulente, suivie par ExoS puis ExoT.

La production des **pigments** évolue également au cours des différentes phases de l'infection. La Pyoverdine étant nécessaire principalement durant la phase aiguë de l'infection, elle diminue au cours du temps¹²⁸. La production de Pyocyanine sera plus stable dans le temps étant donné qu'elle permet à la bactérie de persister dans les poumons des patients, notamment par une activité bactéricide et antifongique. La pyorubine est également connue pour son activité anti-bactérienne et sa capacité à lutter contre le stress oxydatif, elle sera également nécessaire à la persistance de la bactérie chez l'hôte^{129,130}. Enfin, il a été montré, que malgré que le quorum sensing soit un élément de communication essentiel entre les bactéries, un nombre important d'isolats de patients atteints de mucoviscidose ne produisent plus ces molécules. Il a d'une part, été mis en évidence qu'elles n'étaient retrouvées dans les expectorats des patients que dans 20 à 50% des cas¹²². D'autre part, les gènes *lasR* et *rhIR*, à l'origine de leur production, étaient mutés chez un grand nombre de souches de *Pa*, mutation survenant dans les 15ans après l'infection¹³¹.

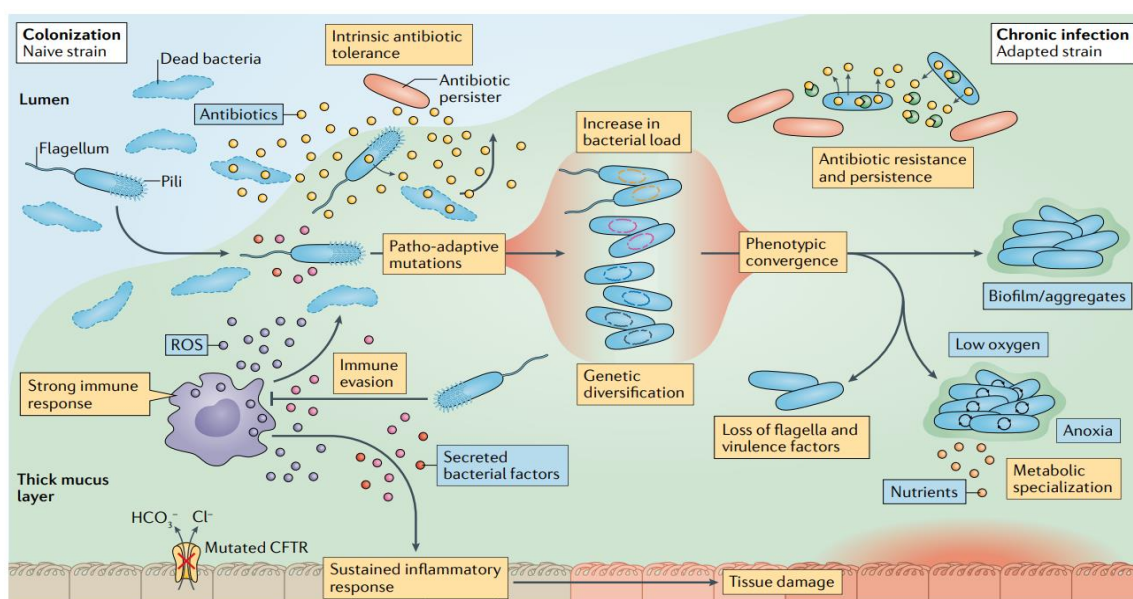


Figure 11 - Résumé des adaptations de *Pa* au cours des infections chroniques de patients atteints de mucoviscidose (issue de Rossi E. et al., Nature Reviews Microbiology, 2021)

➤ 3.5. Immunité à l'encontre de *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose

La réponse immunitaire mise en place contre Pa dans la mucoviscidose, prend en compte l'ensemble des interactions entre les facteurs de virulence produit par Pa et le système immunitaire, mais également les adaptations pulmonaires spécifiques aux infections chroniques et enfin l'environnement pulmonaire pro-inflammatoire décrit dans la mucoviscidose.

▪ 3.5.1. Implication des cellules épithéliales dans la genèse de l'inflammation pulmonaire.

La surexpression de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires mais aussi épithéliales (IL-8, IL-1, TNF α , IL-17) entraîne au niveau pulmonaire un environnement pro-inflammatoire et l'afflux massif de PNN également responsables du relargage massif de cytokines également pro-inflammatoire et de protéases ainsi que de chimiokines responsables d'une boucle d'amplification de l'inflammation locale¹³².

▪ 3.5.2. Immunité innée

• 3.5.2.1. Système du complément

Le système du complément joue un rôle important dans la lutte contre Pa. Il a tout d'abord été mis en évidence que le sérum participait à l'opsonisation et à la phagocytose par l'intermédiaire du complément puisque ce mécanisme était inactivé lorsque le sérum était chauffé. Ceci est notamment médié, en plus de C3, par la voie alternative du complément¹³³. Chez les patients atteints de mucoviscidose, une diminution de l'efficacité de la phagocytose de Pa médiée par le complément a été observée¹³⁴. Il a également été montré que Pa luttait contre le système du complément par le passage de l'état planctonique à celui de biofilm et par la production d'une protéase alcaline qui inhibe C1 et C2 et donc la voie des lectines et la voie classique du complément comme nous l'avons vu auparavant^{81,82}.

• 3.5.2.2. Implication des PNN

Le contexte de la mucoviscidose entraîne des modifications de la réponse immunitaire pulmonaire. La mutation de la protéine CFTR est responsable d'un défaut d'internalisation de Pa par les cellules épithéliales qui fonctionnent comme les récepteurs TLR et active la voie NF κ B^{23,135}. Elle est également responsable d'un défaut de production des interférons de type I¹³⁶. Parallèlement, Pa a la capacité de produire un inhibiteur du CFTR, dénommé Cif pour CFTR Inhibitory Factor¹³⁷. Ceci peut aggraver le déficit observé chez les patients atteints de mucoviscidose présentant un déficit partiel de la protéine CFTR. Cet inhibiteur entraîne la dégradation de la protéine par le lysosome en bloquant sa desubiquitination. Le mécanisme majoritaire par lequel l'altération de la

protéine CFTR affecte la réponse immunitaire pulmonaire est qu'elle est responsable d'une production excessive d'IL-8 par les cellules épithéliales. Cette cytokine entraîne un recrutement dérégulé des PNN au niveau pulmonaire et une sur-inflammation, en dehors de tout contexte infectieux¹³⁸. Si cette réponse exacerbée est néfaste pour les tissus pulmonaires, il a été montré que les PNN sont essentiels dans la réponse aux infections à Pa. En effet, dans un modèle murin d'infection aiguë, la neutropénie entraînait une diminution majeure de la quantité de CFU (Colony Forming Unit) nécessaire pour induire une léthalité¹³⁹. Ceci n'est vrai que pour les bactéries planctoniques, les bactéries ayant formé un biofilm étant inaccessibles. Il est cependant à noter que les patients atteints de mucoviscidose ont des PNN déficients, ne pouvant pas produire d'HOCl ayant une activité microbicide¹⁴⁰. Les PNN sont également capables de produire une élastase ciblant OprF, une porine de la membrane de Pa, permettant ainsi de déstabiliser la membrane. Cependant, cette élastase est également capable de dégrader la protéine CFTR entraînant une boucle d'amplification néfaste¹⁴¹.

• 3.5.2.3. Place des macrophages pulmonaires

Au niveau du macrophage alvéolaire, l'absence de la protéine CFTR entraîne un défaut de fonctionnement de la voie médiée par HIF1 α et l'accumulation de succinate extracellulaire qui a un effet pro-inflammatoire. De la même façon que pour les PNN, une accumulation de macrophages intra-pulmonaire a également été observée en l'absence de toute infection. Ils ont un profil pro-inflammatoire mis en évidence par une augmentation de la production d'IL-1 β , de MCP-1, mais également de iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) retrouvé chez les macrophages de type M1, ainsi qu'une diminution de la production d'IL-10¹⁴². Il est à noter qu'au cours de l'inflammation chronique / infection chronique, les macrophages persistent et notamment les macrophages pro-inflammatoires de type M1 et M2a entraînant le développement d'une fibrose¹⁴³. Murphy BS et son équipe ont montré une proportion plus importante des macrophages de type M2, exprimant l'arginase et n'exprimant pas le TLR-4 dans le LBA, des patients mucoviscidoses¹⁴⁴. Il est intéressant de noter que la proportion de macrophages M2 était inversement proportionnelle au VEMS des patients, ce mécanisme pourrait ainsi permettre à la bactérie d'échapper au système immunitaire et de proliférer chez l'hôte. En plus des variations de l'infiltration pulmonaire par les macrophages, il a été montré que l'efficacité de la phagocytose est altérée par un défaut d'acidification du phagolysosome ne permettant pas la digestion de la bactérie. L'absence d'entrée des ions H⁺ est due à un défaut du transport des ions Chlorure²³. Enfin, il a été montré que la protéine CFTR était nécessaire à l'expression du CD11b à la surface des monocytes et des macrophages¹³⁴.

- 3.5.2.4. Implication des CD

Dans les infections à Pa, les CD représentent la population la moins étudiée. De nombreux mécanismes mis en place par Pa pour lutter contre les CD ont été décrits qu'ils soient médiés par le SST3, la production de l'élastase responsable de la dégradation des protéines de co-stimulation à la surface des CD, ou une cytotoxicité induite par certaines molécules du quorum sensing¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

Il a cependant été mis en évidence que les CD pouvait induire une immunité contre Pa dans des modèles vaccinaux. Deux types d'immunisations ont été utilisées, une immunisation contre l'ensemble de la bactérie après une mise en contact des CD avec Pa et une immunisation contre OprF qui induisait dans ce cas une immunité plutôt de type Th1^{148,149}. Néanmoins, l'inhibition de la production de l'IFN de type I et notamment de l'IFN- β ainsi que la diminution de l'expression des marqueurs de co-stimulation CD40, CD80/86 mais également de la production d'IL-12, ainsi que les immunomodulations induites par les molécules du quorum sensing ne sont pas en faveur du développement d'une réponse lymphocytaire de type Th1^{136,150,151}. Ces mécanismes pourraient également permettre à la bactérie de moduler l'immunité vers d'autres type de polarisation lymphocytaire, voire de diminuer le développement d'une immunité médiée par les lymphocytes effecteurs efficaces à son encontre.

- 3.5.3. Immunité adaptative

Différents types de réponses lymphocytaires sont induites au cours des infections à Pa. Très peu d'études ont montré l'implication des LB dans la réponse immunitaire dirigée contre Pa. Sorensen RU. et son équipe ont cependant montré une corrélation entre un taux élevé de plasmocytes circulants et une bonne fonction respiratoire des patients¹⁵². Néanmoins, ils ont également montré une altération marquée de la capacité des LB à se différencier en plasmocytes *in vitro* chez les patients atteints de mucoviscidose et cette différence n'était pas dû à un environnement immunosuppresseur induit par les T régulateurs¹⁵². Ces premières observations orientent la réponse immunitaire développée contre Pa vers une réponse immunitaire cellulaire plutôt qu'humorale. Comme nous l'avons montré auparavant, les réponses les plus adaptées pour lutter contre les bactéries extra-cellulaires sont initiées par les Th17 et plus accessoirement par les Th1. Il a été mis en évidence que la balance Th1/Th2 dans les infections à Pa était plutôt en faveur du développement d'une immunité pro-Th2. Cependant cette immunité était associée à une réponse défavorable du patient et à une prolifération de la bactérie. Cette balance en faveur des cellules Th2, a été montré par la réalisation d'un dosage des cytokines dans le LBA, mais également produites par les PBMC (Cellules Mononuclées du Sang Périphérique) des patients atteints de mucoviscidose et infectés chroniquement par Pa^{153,154}. En effet, une proportion plus importante des cytokines de types IL-4 et IL-13 a été mise en évidence par rapport à l'IFN γ et à l'IL-2. L'aspect néfaste de cette

immunité de type Th2 n'est pas très bien comprise, car il était attendu par les auteurs que cette immunité « moins pro-inflammatoire » puisse limiter l'inflammation pulmonaire. Moser et son équipe ont proposé que les Th2 induiraient une boucle d'amplification de la réponse pro-inflammatoire médiée par les PNN au niveau pulmonaire¹⁵³. Cela pourrait simplement être dû à l'inhibition du développement d'une immunité médiée par les Th1 permettant d'augmenter la clairance de Pa. De nombreuses études ont montré l'importance de la réponse Th17 dans les infections à Pa. Les mécanismes par lesquels les Th17 permettraient de lutter contre les pathogènes reposeraient sur le recrutement de PNN, une modulation de la réponse Th1 et un équilibre avec les LT régulateurs¹⁵⁵. Le rôle majeur de la réponse Th17 a notamment été mis en évidence dans un modèle murin d'infection aigüe à Pa, dans lequel les souris traitées par anti-IL17 ont présenté des lésions pulmonaires beaucoup plus importantes après l'infection¹⁵⁶. De la même façon, Lorè et son équipe ont également montré que les souris déficientes sur l'axe IL-17/IL-17RA présentaient une diminution des défenses de l'hôte se traduisant par une diminution de la clairance bactérienne¹⁵⁷. En plus de la protection médiée par l'IL-17, il a été montré que les Th17 étaient également capables de créer des « T cell extracellular traps », tout comme nous l'avons décrit pour les PNN, afin de lutter contre les infections¹⁵⁸. L'IL-23 a également été mis en évidence comme jouant un rôle majeur dans le développement de la réponse immunitaire contre Pa¹⁵⁹. Si cela peut être vu comme une inflammation néfaste pour les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, le rôle du développement de ces réponses pro-inflammatoires vis-à-vis de la clairance de Pa n'ont pas été évaluées dans cette étude¹⁵⁹. Au total, l'immunité contre les infections à Pa des patients atteints de mucoviscidose est médiée par une association de réponse Th17 et Th2¹⁶⁰.

➤ 3.6. Métabolomes de Pa et étude par métabolomique

Nous avons montré dans la partie II que la production de métabolites par les bactéries pouvait impacter la réponse immunitaire de l'hôte. Ces modulations sont médiées par les métabolites excrétés qui constituent ce que l'on appelle « l'exométabolome » et qui dépendent des différentes voies métaboliques mises en jeu par la bactérie pour répondre aux stress extérieurs qu'elle perçoit¹⁶¹. Ces stress peuvent être induits par le système immunitaire de l'hôte mais également par les antibiotiques reçus, par les autres pathogènes et enfin par l'environnement nutritif ou plutôt par le manque de nutriments nécessaires à sa prolifération et à sa survie. L'exométabolome est différent à opposer à « l'endométabolome » qui correspond à l'ensemble des métabolites présents dans un système biologique à un instant donné.

▪ 3.6.1. Métabolisme basal de Pa

Pa a un métabolisme respiratoire strict ou aérobie stricte. Elle présente également une respiration en anaérobiose en utilisant le nitrate comme accepteur d'électron et réalisant une dénitrification. C'est une bactérie dite « non exigeante » aussi appelé prototrophe, capable de pousser sur tous les milieux, ne nécessitant pas de facteurs de croissance particuliers. C'est un bacille hautement versatile qui possède de grandes capacités d'adaptation métaboliques et nutritionnelles, lui permettant de vivre et de se développer dans différents environnements et sur différents types de milieux, notamment dans l'eau et les milieux humides. Elle est peut également vivre de manière commensale dans le tube digestif de l'homme¹⁶². Pa possède le génome le plus important du monde bactérien avec 6,3Mbp (Million de paires de bases), pouvant être à l'origine de cette importante adaptabilité¹⁶³. Quatre-vingt-dix pourcents du génome concerne des gènes très conservés qui intègrent notamment la production de facteurs de virulence¹⁶⁴. Les 10% restant permettent à la bactérie d'intégrer de nouveaux éléments à son génome, tels que l'exotoxine U¹⁶⁴.

Le métabolisme énergétique central de Pa est représenté sur la figure 12¹⁶⁵. Frimmersdorf et son équipe ont mis en évidence que Pa présentait un catabolisme énergétique associé à l'oxydation de source de carbone et d'azote issue des acides aminés mais également des SCFA ou des polyamines¹⁶⁶. Elle n'est pas capable de glycolyse mais présente des voies alternatives que sont la voie Entner-Doudoroff et la voie des pentoses phosphate^{165,166}. Les souches « adaptées » de Pa vont également puiser leurs sources de carbone dans les excréments des patients¹⁶⁷. Elles vont également présenter des modifications de ce métabolisme centrale du carbone ainsi que du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). En effet, le cycle TCA est approvisionné par les acides aminés disponibles en grande quantité dans l'environnement. Un shunt de ce cycle, nommé shunt glyoxylate, est également mis en place par la bactérie au cours de son adaptation (Figure 12). Ces modifications diminuent la sensibilité de Pa au stress oxydatif et entraîne une croissance réduite permettant à la bactérie de diminuer ses besoins énergétiques mais également d'augmenter ses résistances aux antibiotiques. Cela lui permet également de faire face à un environnement anoxique retrouvé dans la mucoviscidose. Pour compenser, elle est capable de générer des oxydases qui ont une affinité très élevée pour l'oxygène ou d'utiliser des accepteurs terminaux alternatifs comme l'azote. Pa est habituellement décrite comme bactérie non fermentante, cependant il a été décrit qu'elle possède la capacité de fermenter l'arginine ou le pyruvate¹⁶⁶. Leur métabolisation est cependant diminuée au cours des infections chroniques¹⁶⁷. Enfin, Pa est également capable de produire un certain nombre de métabolites secondaires qui ne servent pas à sa survie mais à son interaction avec l'environnement. Les voies métaboliques impliquées dans ces échanges seront revues dans la partie IV des résultats de la thèse.

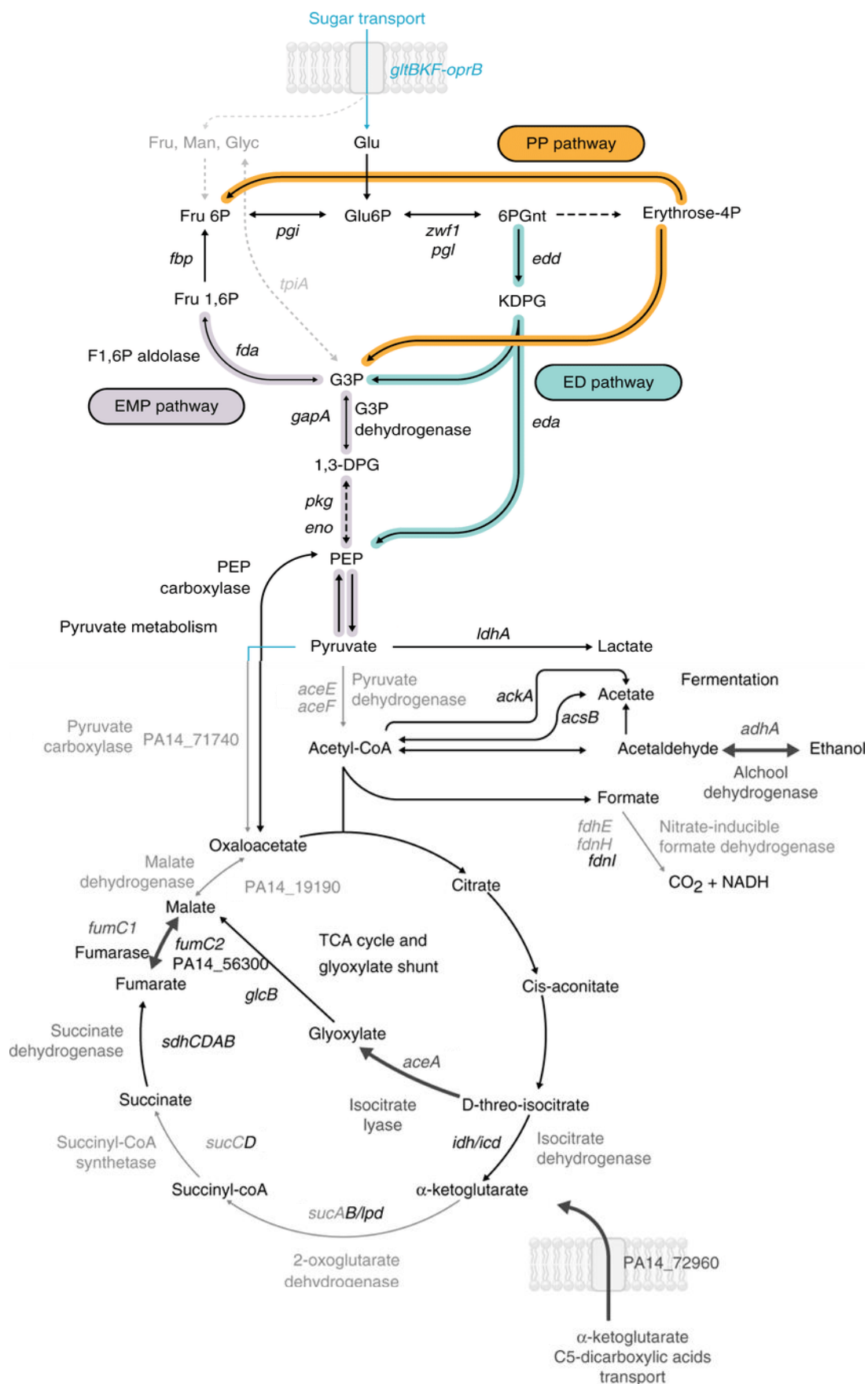


Figure 12 - Présentation des grandes voies impliquées dans le métabolisme énergétique centrale de *Pa* (adapté de Rossi E. et al. Nature Communications, 2018)

▪ 3.6.2. La métabolomique, concept et techniques

Un des moyens pour étudier le métabolisme de Pa et les métabolites excrétés est la métabolomique. Elle permet d'avoir une cartographie complète des métabolites présents à un instant donné dans un système biologique. Les métabolites sont des petites molécules de taille inférieure à 1500Da et concernent des peptides, des acides aminés, des oligonucléotides, des lipides et des xénobiotiques¹⁶⁸. La caractérisation métabolomique est effectuée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). L'approche par LC-MS/MS est sélectionnée pour les études demandant une sensibilité plus élevée. A l'inverse, les études par RMN permettent d'obtenir des résultats robustes et reproductibles d'un automate à l'autre, et sont particulièrement intéressantes pour dégager des informations sur les grandes voies métaboliques mises en jeu dans un système.

La métabolomique est l'approche la plus récente dans le développement des méthodes « -omiques », qui comprends la génomique, la transcriptomique et la protéomique. De nombreuses études de génomique se sont intéressées à Pa qui possède le plus grand génome bactérien augmentant d'autant les possibilités en termes d'étude de la virulence, de la résistance aux antibiotiques ou de l'adaptation de la bactérie au cours des infections chroniques. Cependant, si certaines études ont pu montrer des résultats intéressants en termes de gènes impliqués dans l'évolution de Pa au cours du temps, les liens avec le phénotype de la souche n'ont pas pu être mis en évidence. Ainsi Marvig et son équipe, ont observé une convergence évolutive de 52 gènes sur une banque de 474 souches recueillis de façon longitudinale chez des patients atteints de mucoviscidose¹⁶⁹. Ces gènes étaient impliqués dans l'acquisition de gènes de résistance mais aussi dans la perte de certains facteurs de virulence ou dans l'adaptation du métabolisme centrale. Cependant, ils n'ont pu mettre en évidence aucune corrélation avec le phénotype des souches. De la même façon, Chandler et son équipe ont montré que la majorité du génome, 95%, était conservé entre différentes souches bactériennes de Pa et que les modifications génétiques observées ne permettaient pas d'expliquer les variations phénotypiques observées¹⁷⁰. Des résultats similaires ont pu être observés concernant des souches ayant des séquençages équivalents mais des profils de résistances très variables¹⁷¹. L'absence de corrélations entre le génome et le phénotype des souches peut s'expliquer tout d'abord parce que cela ne prend en compte l'ensemble des modifications épigénétique qui régulent l'expression des gènes de la bactérie. La transcriptomique permet de faire le lien entre la génomique et la métabolomique, même si elle ne prend pas en compte les régulations post-traductionnelles. Une étude de transcriptomique a en effet permis de faire le lien entre des mutations préalablement identifiées chez des isolats de Pa collectés chez des patients atteints de mucoviscidose et des phénotypes d'évolution de Pa connus au cours des infections chroniques¹⁶⁵. Par rapport aux autres techniques « -omiques » la métabolomique est la technique qui nous permet

d'être au plus près du phénotype de la souche. Le work-flow complet des analyses de métabolomique est présenté dans la 3^{ème} partie des résultats. Les grandes étapes sont présentées sur la figure 13 et adaptées pour l'automate que nous utilisons, à savoir un QExactive™ muni d'un système Orbitrap™^{172,173}.

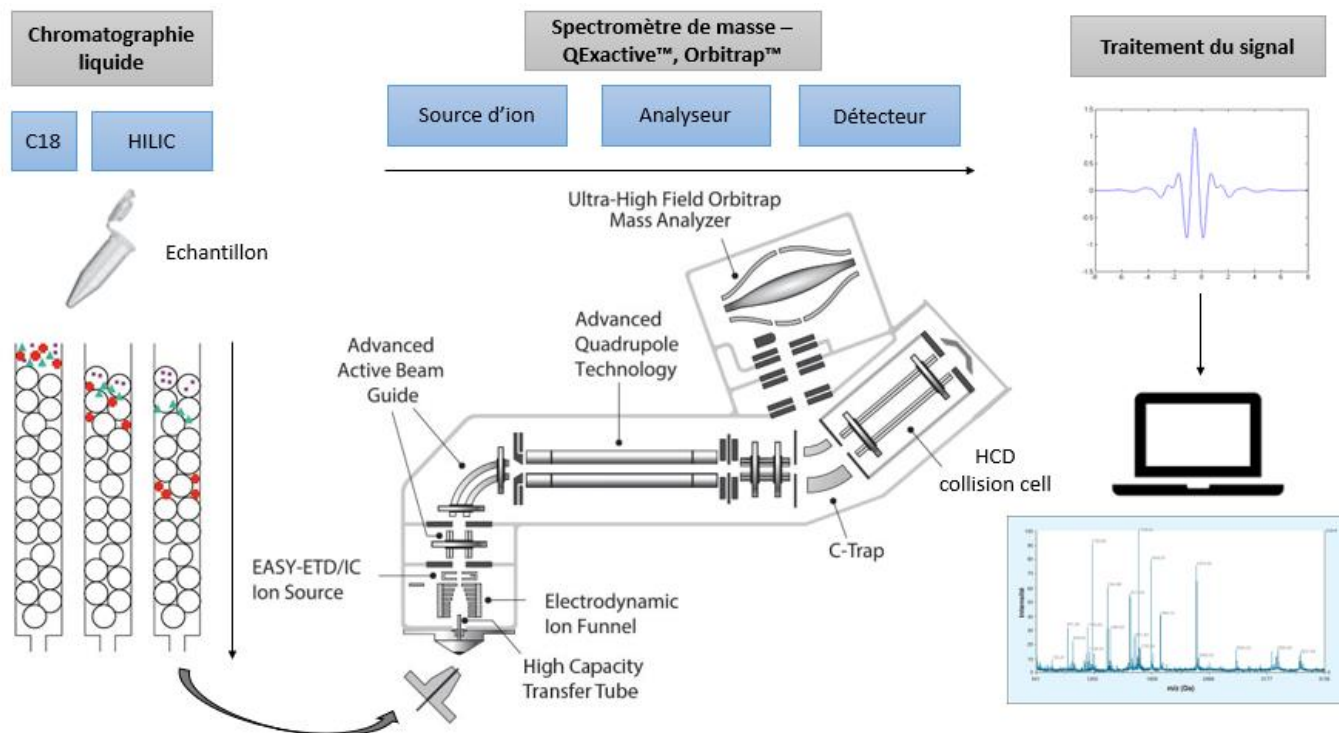


Figure 13 - Présentation des analyses de métabolomique en LC-MS/MS (schéma issu ThermoFisher sur la technologie de spectrométrie de masse et adapté de prof.com pour la partie chromatographie)

Brièvement, la préparation des échantillons, ou étape pré-analytique, consiste en une déprotéinisation pour laquelle différentes méthodes ont été décrites en fonction des métabolites recherchés. Puis les échantillons sont caractérisés par métabolomique non ciblées en LC-MS/MS, qui associe deux techniques différentes :

1- La chromatographie liquide :

Les métabolites sont séparés en fonction de leurs tailles et de leurs propriétés physico-chimiques. Pour cette étape différentes phases liquides peuvent être utilisées et différentes colonnes de chromatographie ont été développées pour permettre l'analyse des métabolites en fonction notamment de leurs propriétés hydrophile ou hydrophobe. Il existe deux principaux types de colonnes qui sont associées pour obtenir une couverture optimale de l'ensemble des métabolites présents dans les échantillons. Les colonnes C18, ou colonne de chromatographie en phase inverse, permettent de réaliser un screening des composés apolaires majoritairement. A l'inverse les colonnes HILIC permettent de cribler les composés polaires.

2- La spectrométrie de masse :

Les métabolites séparés sont ensuite analysés par spectrométrie de masse selon 3 étapes :

- Une première étape d'ionisation pour que les métabolites puissent être chargés, vaporisés, et transférés dans l'automate.
- Une séparation des ions en fonction de leur rapport masse / charge appelé rapport m/z dans ce que l'on nomme un analyseur. La spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS dispose de deux analyseurs, ces analyseurs peuvent être notamment des quadripôles ou des systèmes Orbitrap pour une haute résolution qui fonctionnent grâce à des champs électriques. Entre les systèmes sont disposés des cellules de collision qui permettent de fragmenter les ions « parents » en ions « fils », ce système permet d'affiner la caractérisation et l'identification par la suite des analytes.
- Une détection des ions : permettent l'acquisition d'un signal à partir des ions détectés. Le système orbitrap dont nous venons de parler fonctionne à la fois comme analyseur et comme détecteur.
- Un traitement du signal : qui permet de transformer le signal perçu en rapport m/z et un temps de rétention (RT) qui dépend du temps mis par l'analyte pour traverser aussi bien la colonne de chromatographie que le spectromètre de masse. Ce paramètre est propre à chaque système prenant en compte la combinaison de la colonne et du spectromètre de masse. L'association de deux caractéristiques : m/z et RT constituent ce que l'on appelle un « feature ». L'ensemble des features sont associés dans un chromatogramme qui représente pour chaque features un pic selon l'intensité du signal détecté.

L'ensemble de ces données doivent être retraitées au cours d'étapes de « pré-processing » afin d'obtenir l'ensemble des features présents dans l'échantillon associés à leur intensité représentée par une aire sous la courbe.

La métabolomique présente également des inconvénients. Les métabolites ayant des structures et des caractéristiques physico-chimiques très variées, il est difficile de pouvoir tous les analyser dans ce type d'approches non ciblées. Les étapes pré-analytiques constituent un premier obstacle pour pouvoir évaluer l'ensemble des métabolites de l'échantillon de par les différentes techniques qui peuvent être utilisées pour extraire un maximum d'analytes. Elles doivent également être rapides pour diminuer les risques d'altération au cours de l'expérimentation. Cette première étape participe aux difficultés rencontrées pour rendre la méthode reproductible. La séparation par les différentes colonnes de chromatographie et les méthodes d'analyses par spectrométrie de masse constituent également des freins dans la détection de l'ensemble des features. S'agissant de l'étude

du métabolisme, il existe également une variabilité très importante dépendante des conditions extérieures à la bactérie, comme la croissance en biofilm ou planctonique, le type de milieu utilisé, la phase de croissance... Cette variabilité au niveau des résultats obtenus n'est pas retrouvée dans les études de génomiques si celles-ci ne sont pas réalisées sur une longue durée. Sur un autre versant, les features détectés dans l'échantillon doivent ensuite être identifiés. Cette étape est rendue difficile de par le manque de données et la variabilité inter-laboratoires/techniques. L'acquisition par spectrométrie de masse en tandem permet d'obtenir une fragmentation des ions, donnant une information supplémentaire pour leur identification. Ce nouveau niveau est nommé « MS2 » L'association des différentes techniques dans une approche « multi-omique » est la plus pertinente pour pouvoir caractériser un système en entier.

■ 3.6.3. Etudes métabolomique et Pa

Très peu d'études se sont intéressées à la production de métabolites par les bactéries du microbiote pulmonaire, notamment dû à un problème d'accessibilité mais également au fait que le poumon a longtemps été considéré comme un organe stérile. Nous avons donc accès sur les études de métabolomiques par LC-MS/MS conduites sur Pa et sur les expectorats de patients mucoviscidose, puisque de nombreux biomarqueurs de sévérité et de survenue d'exacerbations ont été recherchés. Les axes évalués ainsi que les métabolites et les voies métaboliques impliquées sont présentées dans le tableau II. Les études s'intéressant à des approches techniques ne seront pas détaillées. Les métabolites identifiés dans chaque études sont présentés dans la dernière colonne du tableau.

Tableau II : Synthèse des études de métabolomique conduites sur Pa et les patients atteints de CF

	Etude	Nombre d'échantillons	Type échantillon	Découvertes - Métabolites ou voie métaboliques identifiées
Etat biofilm / état planctonique	Yung YP. et al., <i>Biofilms and Microbiomes</i> , 2019 ¹⁷⁴	1 souche	Exométabolome	Phénomène de Diauxie inverse identifié dans les cultures planctonique validé également en biofilm.
Phénotypes de virulence	Depke T. et al., <i>Biomolecule</i> , 2020 ¹⁷⁵	35 souches cliniques	Endométabolome	Lien entre la production de biofilm et le métabolome des souches. Augmentation Rhamnolipides, alkyl quinolones, phénazine avec la virulence Metabolome comme biomarqueur
		66 souches cliniques,	Endométabolome	Implication de la voie métabolique des polyamines dans la virulence des souches

Résistance aux antibiotiques	Moyne O. et al., <i>Metabolites</i> , 2021 ³³	longitudinales (32 patients)		Ala-Glu-meso-diaminopimelate associé à l'acquisition de résistance aux β lactamines
	Han ML. et al., <i>Antimicrob Agents Chemo-ther.</i> , 2018 ¹⁷⁶	3 souches	Exométabolome	Identification souches résistantes polymyxine : nouveaux mécanismes de résistance impliquant la spermidine et le niveau de phospholipides
	Hussein M. et al. <i>Antimicrob Agents Chemo-ther.</i> , 2019 ¹⁷⁷	2 souches	Exométabolome	Effet bactéricide association polymyxine-amikacine : inhibition synthèse paroi, perturbation métabolisme centrale du carbone, diminution pool nucléotides
Perturbations dues aux Exacerbations	Quinn RA. et al., <i>Peer J.</i> , 2016 ¹⁷⁸	44 expectorats longitudinaux (11 patients)	Expectorats	Beaucoup de variabilité inter individuel Métabolites augmentés en période d'exacerbations : facteur d'activation plaquettaire (PAF), un lipide apparenté, la monacylglycérophosphocholine, céramide
Interaction avec les pathogènes – étude du microbiome pulmonaire	Silveira CB. et al. <i>Int J Mol Sci.</i> , 2021 ¹⁷⁹	1 patient présentant une exacerbation	Exométabolome	Bactéries associées à une exacerbation : <i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i> , dégradent le mucus et relarguent des produits de fermentation facilitant la croissance de Pa – Biomarqueurs adaptation traitements
	Dunphy LJ. et al., <i>mSystems.</i> , 2021 ¹⁷¹	5 souches Pa (3 cliniques) 4 souches Sa (2 cliniques)	Exométabolome	15 métabolites consommés par Pa et Sa : compétition, marqueurs infection pulmonaire Forte expression de d'acide anthranilique et de DHQ (quinoline 2,4-quinolinediol) par les souches virulentes de Pa
	Frydenlund Michelsen C. et al., <i>ISME J.</i> , 2016 ¹⁸⁰	6 souches de Pa, 2 de Sa, 1 d' <i>Escherichia coli</i>	Exométabolome et cultures solides	Empreintes métaboliques distinctes entre les souches en compétition ou en co-existence avec Sa, notamment facteurs de virulence et 4-hydroxy-2-alkylquinoline (HAQ). HAQ aussi impliqué résistance à la Tobramycine
	Melnik AV. <i>mySystem</i> , 2019 ¹⁸¹	Poumons de 3 patients atteints de CF	Bactéries issues des extraits de tissus	Evaluation de l'interaction des bactéries du microbiote pulmonaire. Production accrue de quinolone par Pa en contact avec Sa ou <i>Granulicatella</i> et découverte d'analogues.

Interaction avec l'immunité	Whiteson K. et al., <i>Clin. & Exp Immunol</i> , 2017 ¹⁸²	5 souches cliniques : 2 Pa, 2 <i>Streptococcus</i> spp et Rm,	Exométabolome	Pa induisait une plus forte production de cytokines pro-inflammatoires par les CD que <i>Streptococcus spp</i> et Rm, Métabolites impliqués : putrescine et glucose
	Quinn RA. et al., <i>ISME Journal</i> , 2016 ¹⁸³	7 expectorats de patients CF et 2 expectorats de patients non-CF	Métabolome expectorats	L'exométabolome de l'ensemble du microbiome pulmonaire est différent de celui de Pa. Les molécules les plus abondantes patients CF: sphingolipides, sphingomyélines, lactosylcéramide pro-inflammatoire.
	Quinn RA. et al., <i>Microbiome</i> , 2019 ¹⁸⁴	103 expectorats (88 patients)	Métabolome expectorats	La diversité moléculaire (peptides, acides aminés) de l'expectora a été associé à un état clinique respiratoire plus sévère, tout comme la sur-représentation de Pa. L'élastase des PNN était très présente dans les expectorats, suggérant une forte protéolyse.
Découverte de nouveaux métabolites	Vinayavekhin N. et al., <i>ACS Chemical Biology</i> , 2009 ¹⁸⁵	1 souche WT et 1 souche mutée	Exométabolome	La corrélations entre les gènes impliqués dans la synthèse de la pyocheline et le métabolome des souches a mis en évidence l'2-alkyl-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylates (ATC) qui est également un sidérophore
Adaptations au stress.	Zanella D. et al., <i>Anal Bioanal Chem.</i> , 2021 ¹⁸⁶	3 souches : Pa, Sa <i>Bacillus cereus</i>	Exométabolome	Comparaison des approches ciblées et non ciblées pour différencier différents pathogènes infectants les patients mucoviscidose, en conditions normales et en réponse au stress.
Evaluation traitements	Ma Y., <i>Int J Food Microbiol.</i> 2021 ¹⁸⁷	1 souche	Exométabolome	Diminution de l'expression de facteurs de virulence de Pa (QS, biofilm) après traitement au N-méthylanthranilate
	Neerincx AH. et al., <i>ERJ Open Res.</i> , 2021 ¹⁸⁸	80 échantillons (expectorats et air exhalé, 20 patients)	Métabolome expectorats et condensats air exhalés	Evaluation de l'effet des médicaments agissant sur le récepteur CFTR, sur le métabolome des expectorats. Changement du métabolome après 3 et 9 mois de traitement

CF : Cystic Fibrosis, mucoviscidose, Rm : *Rothia mucilaginosa*, WT : WildType

Ces résultats montrent que le champ des possibles de ce type d'approche « -omique » innovante est immense et permet aussi bien d'évaluer certains paramètres de la virulence que pour étudier des mécanismes, rechercher de nouveaux biomarqueurs ou investiguer l'intérêt de nouveaux traitements *in vitro*.

Objectifs de la thèse

La modulation du système immunitaire par les bactéries a été mise en évidence dans de nombreux contextes qu'ils soient physiologiques ou pathologiques. Cette modulation, nous l'avons vu précédemment avec le microbiote intestinal, peut être favorable et permettre le développement d'une réponse immunitaire efficace et équilibrée. Cependant, elle peut également être délétère pour l'hôte que ce soit parce qu'elle entraîne une réponse immunitaire dérégulée et inadaptée conduisant à une inflammation exacerbée, ou au contraire parce qu'elle inhibe le développement de la réponse immunitaire, induisant ainsi un mécanisme d'échappement. Un des moyens de moduler l'immunité, que ce soit par les pathogènes ou les cellules cancéreuses, est la production de métabolites ayant des propriétés immunomodulatrices. L'adaptation des voies métaboliques, propres à la cellule ou à la bactérie, permettent ainsi de lutter contre le système immunitaire et de persister chez l'hôte. Pour étudier la production de ces métabolites en contexte pathologique infectieux, il est nécessaire de s'intéresser à des infections chroniques au cours desquels le pathogène a pu mettre en place des mécanismes d'adaptation pour faire face à la pression immunitaire et empêcher son élimination.

L'objectif de ce travail est d'étudier la modulation de l'immunité, médiée par la production de métabolites, par des bactéries responsables d'infections chroniques. Le modèle que nous avons choisi pour cette évaluation est basé sur l'étude d'une banque de souches cliniques de *Pa* responsable d'infection chronique de patients atteints de mucoviscidose. Nous avons tout d'abord étudié les caractéristiques cliniques des patients de l'étude puis nous avons conduit deux types de caractérisations sur les métabolites excrétés par les souches cliniques de la banque, ou exométabolome. Une caractérisation immunologique consistant à évaluer l'impact des exométabolomes sur la modulation de l'activation et de la maturation des CD puis sur la polarisation T subséquente. Les observations effectuées *in vitro* sont évaluées *in vivo* sur des modèles murins de challenge infectieux. En parallèle, nous avons développé une méthode nous permettant de réaliser une caractérisation métabolomique par LC-MS/MS afin d'étudier les métabolites excrétés par les souches. Les résultats obtenus par ces deux approches ont ensuite été corrélés afin d'identifier de potentiels métabolites immunomodulateurs. Enfin, les propriétés immuno-modulatrices des métabolites d'intérêts identifiés sont validées *in vitro* et *in vivo*.

Ces résultats nous permettent de mieux comprendre l'interaction hôte/pathogène et notamment d'étudier comment les souches responsables d'infections chroniques peuvent moduler l'immunité afin de persister chez l'hôte. Les métabolites identifiés et les voies métaboliques associées constituent de nouvelles cibles thérapeutiques d'intérêt pour restaurer l'immunité des patients.

Work flow du projet de thèse

Banque de souches cliniques – *Chapitre I*

Inclusion de **32 patients** atteints de **mucoviscidose** souffrant d'**infection chronique** à *Pseudomonas aeruginosa*
Deux souches de la même bactérie isolées à **5ans d'intervalle**

- Evaluation de la fonction respiratoire des patients inclus dans l'étude et de son évolution au cours des 5ans
- Investigation des co-infections
- Caractérisation des isolats

Culture des isolats cliniques - *Chapitre I*

En milieu **SCFM** : reproduit l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose.
→ Collecte des **surnageants en phase exponentielle et stationnaire**, puis **déprotéinisation**.

Etude de *L'Exométabolome* : ensemble des métabolites produits et relargués par *Pa*, élément d'interaction avec le microenvironnement pulmonaire et immunitaire

Caractérisations immunologiques – *Chapitre II*

- Mise au point d'un test immunologique *in vitro* et validation sur :
- Métabolites purifiés ayant des propriétés immunomodulatrices
 - SN complexes de souches bio-ingéniérées
- **Identification de différentes propriétés immunomodulatrices médiées par l'exométabolome des isolats cliniques**
- Validation des propriétés immunomodulatrices identifiées :
- *in vitro* : co-culture DC-LT, évaluation polarisation LT
 - *in vivo* : modèles murins d'infection bactériennes

Corrélation avec les **données cliniques** des patients

Caractérisations métabolomiques - *Chapitre III*

- Approche *LC-MS/MS*
- Mise au point de méthode sur C18 et HILIC
 - Mise au point du workflow de pré processing des données
- Caractérisation de l'**exométabolome** des souches cliniques

Corrélation avec le **phénotype des souches** : aspects, virulence

Corrélation des résultats – *Chapitre IV* : Identification de métabolites immunomodulateurs

- Validation du potentiel immunomodulateur des métabolites par analyse de manière purifiée
- **Test immunologique *in vitro*** sur CD
 - Polarisation T (co-culture allogénique DC-LT)

Investigation de l'impact des métabolites excrétés ou de métabolites purifiés sur la réponse immunitaire induite vis-à-vis des souches immunostimulantes et immunosuppressives, dans un **modèle murin *in vivo***.

*Chapitre I – Modèle d'étude de la modulation du système immunitaire par les bactéries en condition pathologique : infection chronique de patients atteints de mucoviscidose par *Pseudomonas aeruginosa*.*

I. Préambule

Afin d'étudier les interactions hôte-pathogène et notamment les modulations de l'immunité induites par les bactéries, nous avons utilisé comme modèle l'infection chronique de patients atteints de mucoviscidose par Pa. Nous avons donc conduit cette étude sur des souches cliniques de Pa prélevées au cours de la prise en charge de patients chroniquement infectés. Les patients dont sont issues ces souches ont été inclus dans l'étude clinique et les isolats ont été rassemblés dans une banque par O. Moyne au cours de sa thèse réalisée au sein du laboratoire.

Nous présenterons dans la 1^{ère} partie de ce chapitre l'étude clinique ainsi que les caractéristiques des patients inclus et l'existence de co-infections nous permettant d'appréhender les interactions de la bactérie au sein de l'environnement pulmonaire des patients. Dans une 2^{ème} partie, nous décrirons la constitution de la banque de souches de Pa et nous présenterons également la façon dont les souches cliniques ont été cultivées pour répondre aux contraintes des caractérisations immunologiques et métabolomiques réalisées par la suite.

II. Cohorte des patients atteints de mucoviscidose

1. Critères de constitution de la cohorte de patients

Les isolats ont été sélectionnés de façon rétrospective à partir d'une collection constituée par le service de bactériologie du CHU Grenoble-Alpes entre 2010 et 2015. Les souches sélectionnées devaient avoir été isolées chez des patients répondant aux critères d'inclusion suivants :

- Prélèvement de patients atteints de mucoviscidose.
- Patients âgés de plus de 18ans.
- Infection chronique diagnostiquée.
- Prélèvements longitudinaux pour chacun des patients.
- Période d'inclusion : patients suivis entre 2010 et 2015.
- Les prélèvements devaient avoir été effectués en dehors des périodes d'exacerbations.

Trente-deux patients répondant à l'ensemble de ces critères ont ainsi été inclus. Un protocole a été déposé à la DRCI (Délégation à la recherche clinique et à l'innovation) pour cette étude rétrospective et les patients après avoir été informés de sa conduite, ne se sont pas opposés à leur participation.

Les patients souffrant de mucoviscidose ont un suivi régulier par le CRCM au cours duquel sont réalisés un examen clinique, un EFR (présenté dans la partie introduction), un bilan biologique avec notamment la réalisation de prélèvements de types crachats ou expectorats pour les analyses bactériologiques. Un suivi thérapeutique est également effectué auprès de ces patients afin d'adapter l'ensemble des traitements et d'améliorer leur observance dans le cadre d'une prise en charge conséquente au long court.

Un recueil de ces données a été effectué afin d'évaluer :

- L'évolution de la fonction respiratoire au cours du temps.
- L'existence d'un déficit des fonctions respiratoires.
- La fréquence des exacerbations pour chaque patient.
- L'existence de co-infections bactériennes ou fongiques.
- La survenue d'un décès pour cause respiratoire.

Ce recueil des données des patients a été déclaré auprès de la CNIL (Commission Nationale Informatique et Liberté, numéro 2205066 v 0).

2. Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude

Les caractéristiques cliniques des 32 patients inclus dans l'étude sont présentées dans le tableau III. Elles ont été évaluées sur la période allant de 2010 à 2015 pour permettre le même suivi pour l'ensemble des patients. Les patients de cette cohorte étaient âgés de 18 à 44ans, avec une médiane de 26ans, à l'inclusion dans l'étude. Il s'agissait d'une majorité d'homme à 56%. La durée de l'infection était très hétérogène, allant de 2 à 30 ans avec une médiane de 17ans. La fonction respiratoire des patients a été évaluée au moment du recueil de chacun des isolats précoces ou tardifs, et sur la période 2010-2015 concernant l'évolution au cours du temps. Au sein de notre cohorte, 50% et 41% des patients présentaient un VEMS supérieur à 50% au moment du prélèvement des isolats Précoces et Tardifs, respectivement. Il est également intéressant de noter qu'aucun des patients ne présentait un VEMS inférieur à 30% au moment du prélèvement des isolats précoces alors que 9% d'entre eux avaient dépassé ce seuil au moment du prélèvement de l'isolat tardif. Ce seuil de 30% constitue le seuil à partir duquel les patients peuvent être inscrits sur liste de greffe pulmonaire¹⁸⁹. Trois décès pour cause respiratoire ont été observés dans la cohorte au cours de la période de suivi.

Tableau III : Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude (n=32).

			N	%
Age (intervalle, médiane)			18 à 44 ans, 26ans	
Genre	Homme		18	56%
	Femme		14	44%
Durée de l'infection (intervalle, médiane)			2 à 30 ans, 17ans	
Fonctions respiratoires	Prélèvement précoce	VEMS < 50%	16	50%
		VEMS < 30%	0	0%
	Prélèvement tardif	VEMS < 50%	19	59%
		VEMS < 30%	3	9%
	Évolution au cours du temps	Déclin	16	50%
		Stable	16	50%
	Exacerbations	Fréquentes	14	44%
		Stable	18	56%
Décès pour cause respiratoire			3	9%

Il est intéressant de noter que nous ne retrouvons pas d'homogénéité dans l'évolution des VEMS des patients entre les isolats précoces et tardifs. Cependant, une diminution globale statistiquement significative de 4% a pu être mise en évidence (test de Wilcoxon pour données appariés, p-value = 0.0059) (Figure 14).

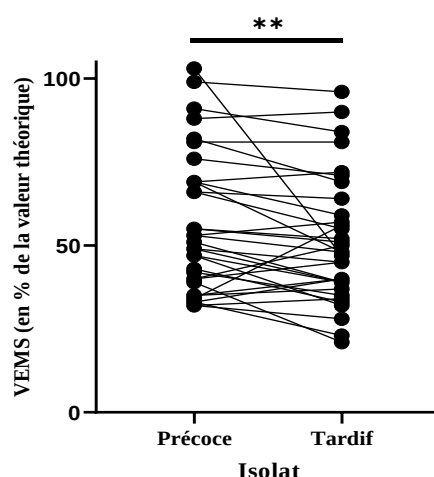


Figure 14 - Variation de la valeur du VEMS exprimé en pourcentage de la valeur théorique (c'est-à-dire qui prend en compte la taille, le poids et l'âge du patient) entre le moment du recueil des isolats précoces et tardifs pour l'ensemble des patients de la cohorte (n = 32). Une diminution globale est observée, sans qu'une évolution commune puisse être identifiée (** : p-value < 0.001).

L'évolution de la fonction respiratoire des patients au cours des 5ans a été évaluée par la pente de la droite de régression. Les patients présentant une diminution de leur fonction respiratoire

de plus de 10% au cours du suivi ont été déclarés comme en déclin^{190,191}. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que 50% des patients inclus dans l'étude présentaient une diminution de leur fonction respiratoire au cours du temps. Il a été montré que la fonction respiratoire des patients variait en fonction de leur âge mais également en fonction de la durée de l'infection⁴⁶. Ainsi, pour évaluer uniquement l'infection par la souche de Pa collectée et s'affranchir des biais induits par ces deux paramètres, nous avons évalué s'il y avait des différences entre les patients présentant un déclin des fonctions respiratoires et ceux ayant une fonction respiratoire stable au cours du temps. Tout d'abord concernant la durée de l'infection, nous pouvons observer sur la figure 15 que malgré le fait que la chronicité de l'infection semble un peu plus récente dans le groupe en déclin, il n'y a pas de différence significative (Figure 15 A et B). Il est cependant à noter que la date à laquelle le patient a été déclaré comme infecté chroniquement par Pa n'était disponible que pour 25 patients dans l'étude. Ceci est notamment dû à la difficulté de diagnostiquer précisément le moment du passage à la chronicité, par rapport à la répétition des infections aiguës. Nous avons également montré qu'il n'y avait pas de disparités entre les deux groupes concernant l'âge des patients à l'inclusion dans l'étude (Figure 15 C). Ainsi, les différences observées dans l'évolution des fonctions respiratoires des patients ne sont donc pas dues à ces facteurs confondants.

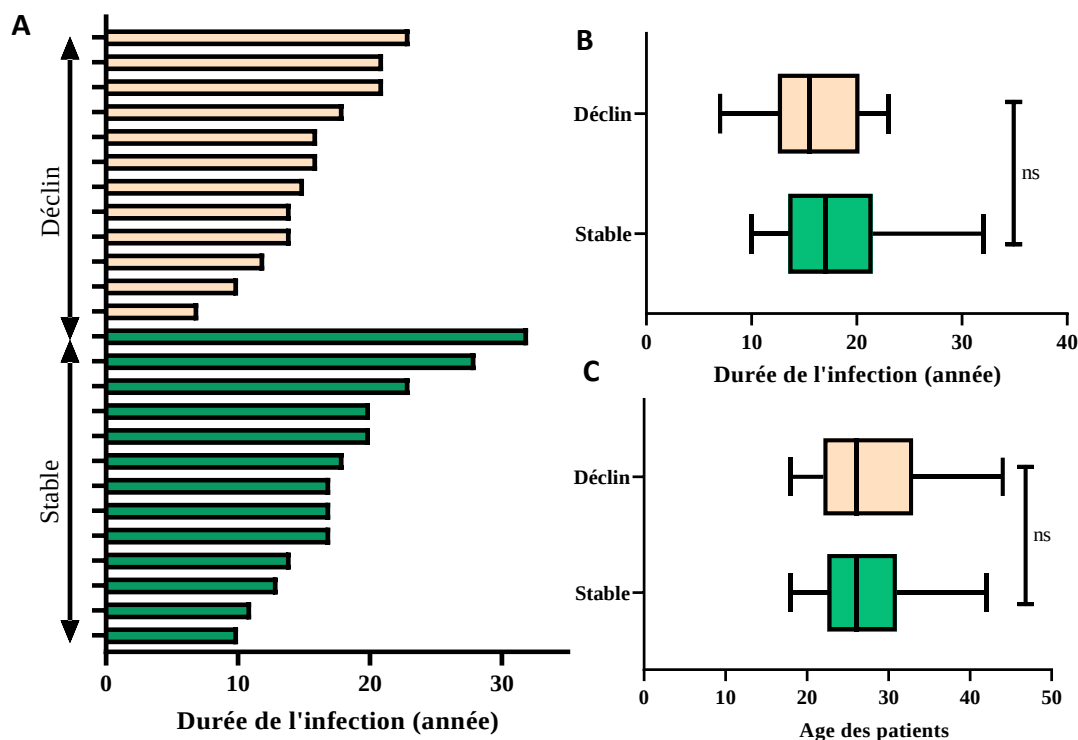


Figure 15 – Impact de la durée de l'infection et de l'âge des patients sur l'évolution de la fonction respiratoire. Représentation de la durée de l'infection chronique par patients (A) et par groupe (B) selon l'évolution globale de leur fonction respiratoire au cours de l'étude : stable ou en déclin. La date du passage à la chronicité n'était disponible que pour 25 des 32 patients de la cohorte. La durée de l'infection n'est pas un paramètre qui impacte l'évolution de la fonction respiratoire au cours du temps. L'âge des patients par groupe était également similaire (C). Les différences d'évolution ne sont donc pas dues à des phases distinctes d'évolution de la maladie, comme cela a pu être observé pour les patients ayant plus ou moins de 20ans (cf fig. 8)

Enfin, il est important de prendre en compte la survenue d'exacerbations chez les patients. Celles-ci peuvent impacter l'évolution de la fonction respiratoire et participer au déclin progressif observé au cours du suivi pour la moitié des patients de la cohorte. Les exacerbations sont difficiles à diagnostiquer car, comme précisé au cours de l'introduction, elles dépendent d'un certain nombre de paramètres qui ne sont pas toujours objectivables. Ainsi pour s'affranchir du biais d'évaluation et de la réponse des patients au traitement, nous avons pris en compte la variabilité du VEMS au cours du temps que nous avons mesurée par l'analyse du coefficient de variation. Un seuil à 15% de variation a été choisi pour déclarer le patient comme présentant des exacerbations fréquentes. Ainsi, 44% des patients dans l'étude présentaient une fonction respiratoire instable.

Il est intéressant de noter que les patients présentant un déclin de la fonction respiratoire au cours du temps sont également ceux ayant la fonction respiratoire la plus instable avec de nombreuses exacerbations (test exact de Fisher, p-value = 0,01) (Figure 16A). Le déclin observé pourrait s'expliquer par la survenue plus fréquente de ces exacerbations comme cela a déjà été décrit par Donaldson GC. et son équipe dans les infections chroniques obstructives¹⁹². Waters V. a également décrit les effets des exacerbations sur le déclin de la fonction respiratoire à long terme des patients atteints de mucoviscidose¹⁹³. Ces exacerbations peuvent être dues à un certain nombre d'éléments et notamment à une infection chronique par Pa^{194,195}. Un mauvais contrôle de l'infection par le système immunitaire pourrait être une cause d'exacerbations plus fréquentes chez ces patients et pourrait expliquer pourquoi certaines études ne retrouvent pas de lien entre l'infection par Pa et les exacerbations^{196,197}. Nous verrons ultérieurement si nos données peuvent étayer cette hypothèse.

Afin d'évaluer les conséquences du déclin ou de l'instabilité sur le VEMS des patients, nous avons tout d'abord pris en compte la valeur médiane du VEMS sur les 5 ans de suivi. Ceci nous permet de nous affranchir de valeurs anormalement hautes ou basses au moment du prélèvement (même s'il est entendu que les prélèvements ont été effectués en dehors des périodes d'exacerbations). Aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre les groupes en fonction du déclin ou de la fréquence des exacerbations (Figure 16 B).

Une comparaison des VEMS lors du prélèvement des isolats Précoces et Tardifs dans chaque groupe de patients a alors été réalisée. S'il n'existait aucune différence de valeur du VEMS des patients au moment du prélèvement de l'isolat précoce, les patients présentant un déclin de leur fonction respiratoire et/ou une instabilité, avaient un VEMS diminué par rapport aux patients ayant une fonction respiratoire stable et peu d'exacerbations au moment du prélèvement de l'isolat tardif. En effet, les patients présentaient un VEMS moyen de 42,88% et 43,14% contre 59,31% et 57,28% respectivement (p-value = 0.02, test de Mann-Whitney). Les résultats sont représentés par un violon

plot sur la Figure 17, représentation qui nous permet de visualiser la distribution du VEMS pour chaque groupe de patients.

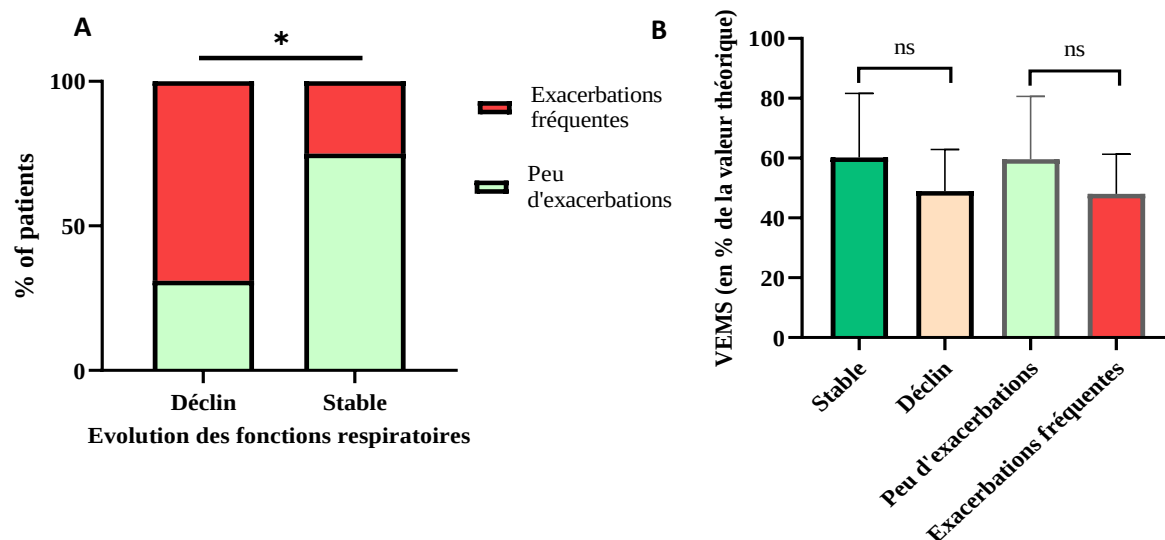


Figure 16 – Evaluation des fonctions respiratoires des patients de la cohorte au cours du suivi de l'étude. Représentation de la proportion de patients présentant des exacerbations fréquentes ou au contraire une fonction respiratoire stable, en fonction de l'évolution de leur fonction respiratoire au cours de l'étude (A) (* : p -value < 0.05). Impact de l'instabilité et du déclin de la fonction respiratoire au cours du temps sur la valeur du VEMS médian de l'ensemble des patients (B).

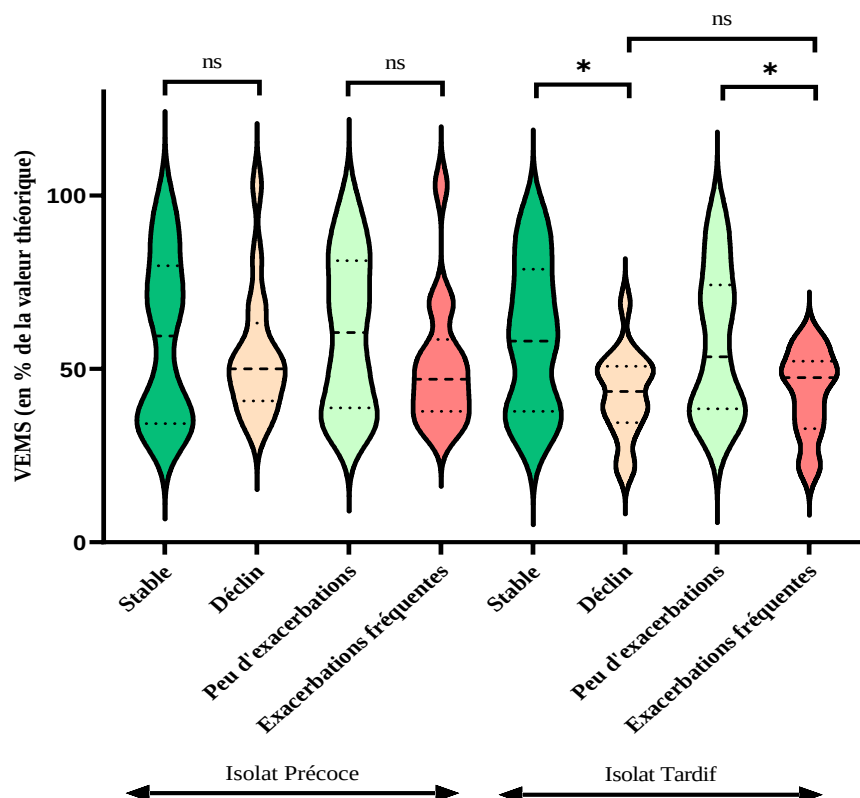
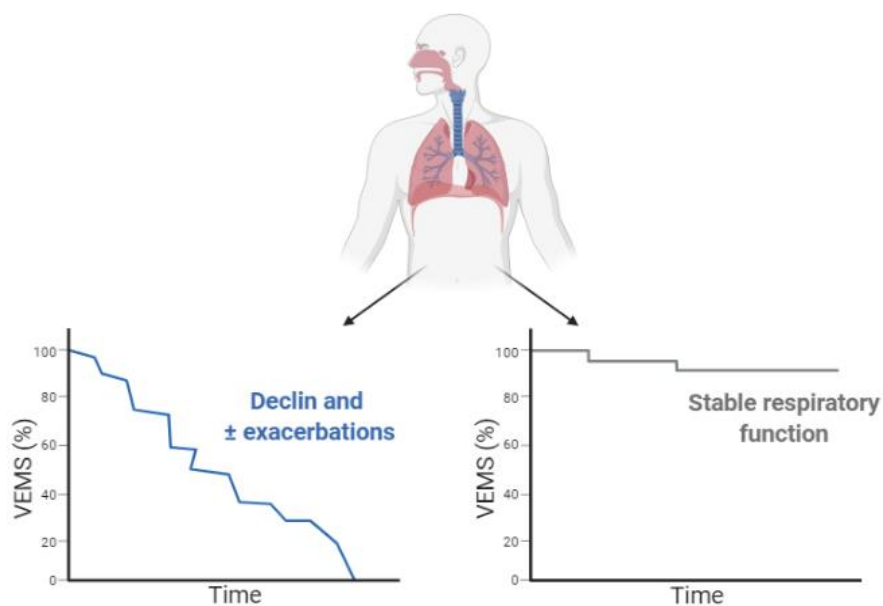


Figure 17 – Représentation en violine plot de la valeur du VEMS lors du prélèvement des isolats précoces et tardifs en fonction des différents paramètres permettant d'évaluer la fonction respiratoire des patients : stable ou en déclin et présentant des exacerbations fréquentes ou peu d'exacerbations (ns : non significatif, * : p -value < 0.05). Si aucune différence n'a pas pu être observée entre les groupes au début de l'étude, celle-ci est visible pour chaque groupe au moment du recueil de l'isolat Tardif.

En conclusion, deux profils différents de patients infectés chroniquement par Pa ont pu être mis en évidence au sein de cette cohorte. Des patients qui présentaient un déclin de la fonction respiratoire au cours des 5 ans de suivi, ainsi qu'un nombre plus important d'exacerbations objectivées par une fonction respiratoire plus basse à la fin de l'étude et une variabilité importante du VEMS. De l'autre côté, des patients présentant une fonction respiratoire stable, avec peu d'exacerbations, se traduisant par une fonction respiratoire significativement plus haute à la fin du suivi. De façon intéressante, nous avons pu montrer que les différences observées étaient indépendantes de l'âge du patient et de la durée de l'infection à Pa.



III. Co-infections des patients de la cohorte

Les patients atteints de mucoviscidose peuvent présenter de nombreuses co-infections bactériennes ou fongiques en parallèle de l'infection chronique à Pa. Les co-infections influencent l'environnement pulmonaire et donc le micro-environnement de Pa, mais elles exercent également des pressions directes, en plus de celles exercées par l'hôte. Il a ainsi été montré que lorsque Pa était cultivée en présence de *Candida albicans*, l'expression du QS par Pa était plus importante ainsi que la production de sidérophores telles que la pyoverdine ou la pyocyanine¹⁹⁸. La présence des autres micro-organismes a été répertoriée pour les patients de la cohorte, notamment concernant les espèces pathogènes puisque la lutte pour la niche écologique sera plus importante par rapport aux bactéries peu ou non pathogènes.

1. Matériel et Méthode

Pour cela, nous avons réalisé une extraction des données de toutes les analyses de bactériologie et de mycologie réalisées au Laboratoire de Biologie Médicale du CHU Grenoble-Alpes entre 2010 et 2015. Certains germes sont identifiés à partir du prélèvement mais sont non pathogènes, nous avons ainsi sélectionné comme micro-organismes pathogènes, les bactéries suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium spp.*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella spp.* et pour les infections fongiques : *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *spp.* et *Aspergillus fumigatus* et *ssp.*

Différents types de prélèvements ont été analysés pour obtenir ces identifications : des expectorations, des lavages bronchoalvéolaires et des aspirations bronchiques. Brièvement, après ajout de fluidifiants, un étalement est réalisé sur géloses enrichies (gélose au sang, gélose chocolat), sur gélose Drigalski pour les BGN non exigeants, sur géloses BCSA pour l'isolation de *Burkholderia cepacia*, sur géloses au sang enrichies en acide nalidixique pour *Staphylococcus aureus*, et gélose Haemophilus pour les souches d'*Haemophilus influenzae*.

2. Résultats des co-infections et des colonisations des patients de l'étude

➤ 2.1. Co-infections identifiées chez les patients infectés chroniquement par Pa

L'ensemble des résultats sont présentés sur le tableau IV. La proportion des co-infections a tout d'abord été évaluée sur les prélèvements effectués pour l'ensemble des patients. Le germe majoritairement retrouvé est *Staphylococcus aureus* puis *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Mycobacterium spp.*, et enfin *Stenotrophomonas maltophilia*. Ces co-infections ne concernaient pas l'ensemble des patients. Quatre-vingt-un pourcents des patients présentaient des

co-infections à *Staphylococcus aureus* (Sa), il est donc le premier germe responsable d'infection chez les patients de cette cohorte, comme cela a été mis en évidence par Folkesson A. et al. Le 2^{ème} germe le plus souvent retrouvé chez les patients était *Streptococcus spp.* On retrouve ensuite *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans* chez 28% et 16% des patients respectivement, et enfin *Haemophilus spp.* pour 13% d'entre eux. Les infections à *Burkholderia cepacia* ne concernaient que 2 patients de la cohorte mais dans les deux cas il s'agissait d'une infection chronique, c'est pour cela que ce germe présente une forte prévalence.

De nombreuses co-infections fongiques ont également été répertoriées avec un ou deux germes prédominants : *Candida albicans*, retrouvés chez la totalité des patients et représentant près de 50% des infections fongiques et *Aspergillus fumigatus*, infectant 88% des patients. Ces résultats montrent une proportion plus importante de patients infectés par *Aspergillus fumigatus* que celle rapportée par Paugam G. et son équipe, ayant montré chez 201 patients une proportion de 57% de patients infectés¹⁹⁹. Dans cette cohorte, ils ont pu montrer une association fréquente avec les infections à Pa (p-value à 0,07). Ceci pourrait expliquer un enrichissement du nombre de patients présentant une infection par *Aspergillus fumigatus* dans notre cohorte de patient préalablement sélectionnés pour leur infection chronique à Pa.

Tableau IV : Description des germes responsables de co-infections. Présentation de la proportion de chaque germe sur l'ensemble des prélèvements des patients de la cohorte ainsi que du nombre de patients concernés.

	Type de micro-organisme	Genre espèce	Proportion sur l'ensemble germes	Patients, n (%)
Co-infections	Bactériennes	<i>Staphylococcus aureus</i>	37%	26 (81%)
		<i>Burkholderia cepacia</i>	11%	2 (6%)
		<i>Haemophilus spp.</i>	< 1%	4 (13%)
		<i>Klebsiella spp.</i>	< 1%	3 (9%)
		<i>Streptococcus spp.</i>	2%	10 (31%)
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4%	9 (28%)
		<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	8%	5 (16%)
		<i>Chryseobacterium spp.</i>	< 1%	3 (9%)
		<i>Mycobacterium spp.</i>	7%	3 (9%)
	Fongiques	<i>Candida albicans</i>	48%	31 (97%)
		<i>Candida glabrata</i>	3%	8 (25%)
		<i>Candida spp.</i>	7%	18 (56%)
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	15%	28 (88%)
		<i>Aspergillus spp.</i>	4%	20 (62%)

Il a été décrit que le nombre d'infections à Sa diminuait au cours de l'évolution de la maladie⁵⁸. Pour analyser ce paramètre nous avons stratifié les patients de 18 à 25ans, de 25ans à 35ans et les patients de plus de 35 ans. Le pourcentage d'infections à Sa en fonction du nombre de prélèvements effectués chez le patient a ensuite été évalué. Nous voyons sur la figure 18A, comme ce qui a été décrit dans la littérature, le nombre de co-infections à Sa diminue avec l'âge des patients, notamment autour des 22ans. Cependant nous observons également que les patients de plus de 35 ans (n=3) présentent un nombre élevé de co-infections à Sa. Sur l'ensemble de la cohorte, la proportion de co-infection peut atteindre 70% tandis que 10 patients (31%) n'ont présenté aucune co-infection à Sa (Figure 19).

La proportion des infections à *Candida albicans* diminuait également avec l'âge des patients (Figure 18B). Nous observons également qu'un seul patient ne présentait aucune co-infection à *Candida albicans* (Ca), à l'inverse la proportion de co-infections pouvait atteindre 86%. Nous observons également sur la Figure 19, pour laquelle nous avons organisé les patients par proportion croissance d'infection à Sa, qu'il n'y a pas de corrélation avec l'infection par Ca.

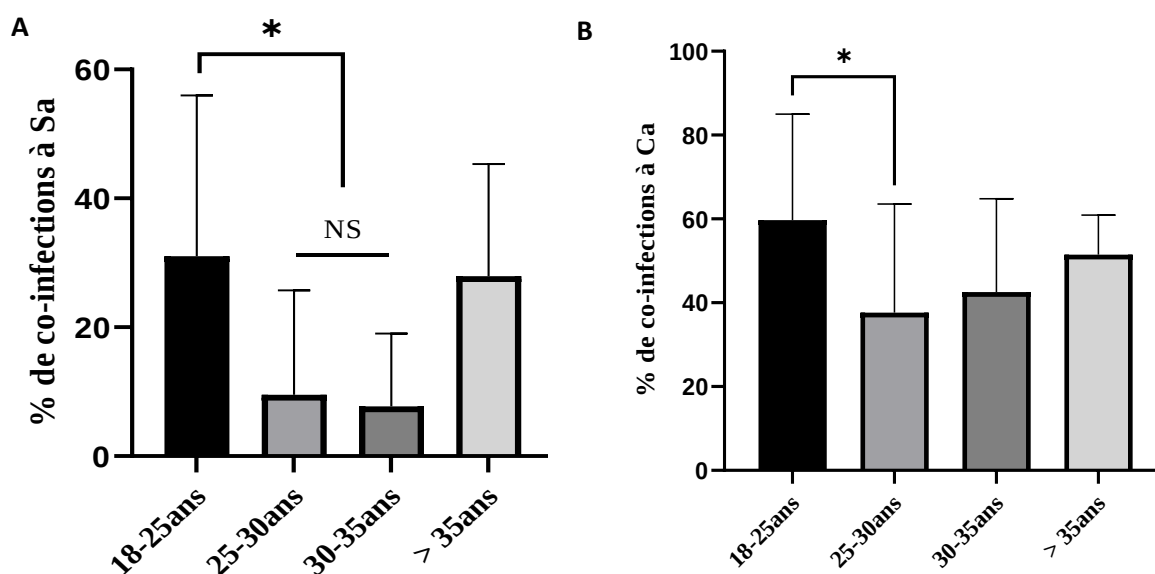


Figure 18 - Proportion de co-infections à Sa (A) ou à Ca (B) identifiées en fonction de l'âge des patients. Les patients sont regroupés par tranche d'âge : de 18 à 25ans puis de 25 à 30ans, de 30 à 35 ans et de plus de 35ans. Une diminution significative des co-infections à Sa a été identifiée à partir de 25ans, avec cependant une proportion plus importante pour les patients âgés de plus de 35ans ce qui concerne 3 patients dans l'étude. Les co-infections à Ca sont plus fréquentes, comme cela a été montré dans le tableau IV. Si une diminution significative des co-infections à Ca est également observée après 25ans, cela est moins marqué pour les patients plus âgés (NS : non significatif, * : p-value = 0.05).

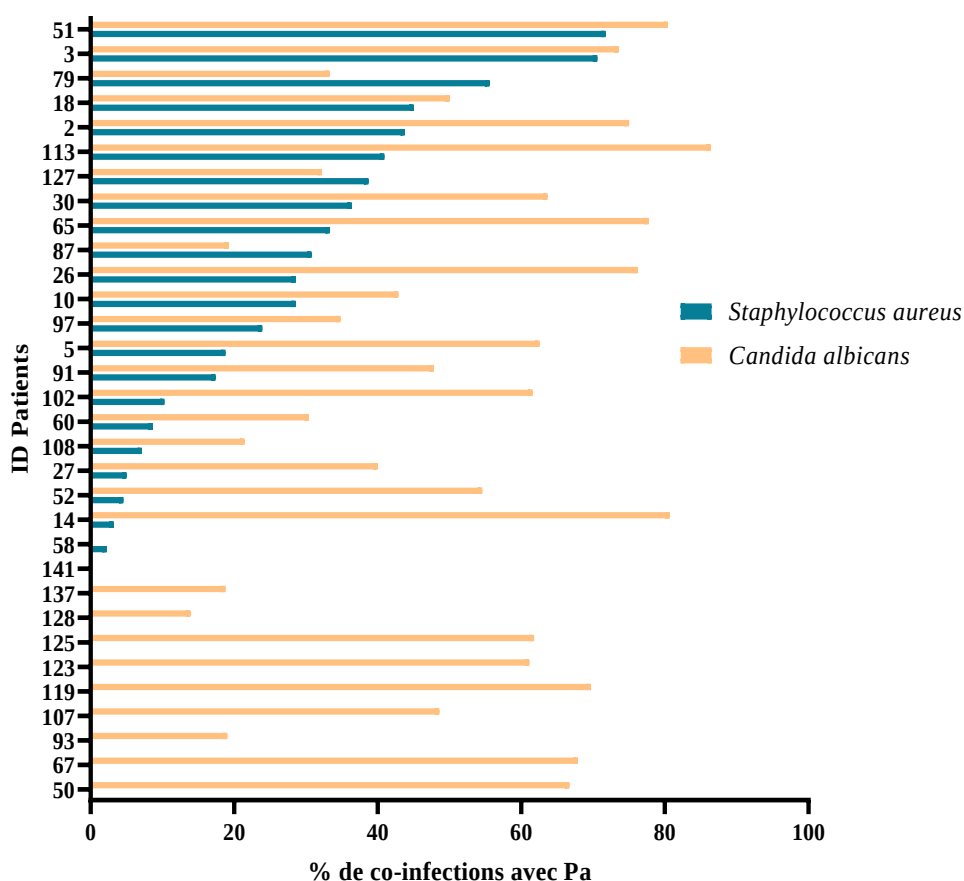


Figure 19 - Le nombre de co-infections identifié au cours du suivi de l'étude a été répertorié afin d'identifier la proportion d'infections à Ca et Sa pour chaque patient de la cohorte. La fréquence des co-infections est variable entre les patients, avec une supériorité des co-infections à Ca par rapport à Sa. Certains des patients n'ont présenté aucune co-infection à Sa ou à Ca au cours des 5ans, ceci concerne 10 patients et 2 respectivement.

➤ 2.2. Colonisations identifiées par Sa chez les patients de la cohorte

▪ 2.2.1. Définition des infections chroniques

Il est difficile de différencier une infection chronique d'une infection répétée par le même germe. Dans les infections à *Staphylococcus aureus*, le statut d'infection chronique / de colonisation ou de r  -infections répétées est encore débattu. Les critères de Leeds définissent les infections comme chroniques à partir de 50% de prélèvements positifs sur 12mois, intermittentes s'il y a moins de 50% ou absentes si aucun prélèvement positif n'a été d  tect  ²⁰⁰. Cependant ces critères présentent des limites et sont encore discutés, notamment car les patients n'ont pas automatiquement un prélèvement mensuel. Les conférences de consensus européennes définissent l'infection chronique par 3 prélèvements positifs en 6 mois, si présence de lésions tissulaires²⁰¹. En cas d'absence de lésion tissulaire on parle de colonisation chronique. Pour déterminer l'aspect chronique de l'infection à Sa, nous nous sommes basés sur ces deux approches, permettant d'identifier 17 patients qui présentaient une colonisation chronique.

■ 2.2.2. Interactions bactériennes entre Pa et Sa

Il est habituellement décrit que Pa et Sa présentent plutôt un mécanisme de compétition chez le patient jeune puis développent des stratégies pour co-exister²⁰². L'existence de co-infections avec *Staphylococcus aureus* (Sa) a un impact pronostique majeur dès le plus jeune âge des patients. Il a en effet été montré par Hudson V. et son équipe que l'existence de co-infection Pa – Sa chez les enfants de moins de 2ans entraînait une diminution marquée de la survie à 10ans des patients, par rapport aux enfants non infectés ou infectés uniquement par Pa ou Sa²⁰³. Cette étude ayant été réalisée en 1993, ne prend pas en compte les importants progrès thérapeutiques de ces dernières années. Une étude plus récente de 2021, a mis en évidence que les enfants co-infectés par les deux bactéries présentaient plus d'exacerbations et d'hospitalisations que les enfants infectés uniquement par l'une des deux souches²⁰⁴. Ils ont cependant aussi mis en évidence que les enfants infectés uniquement par Pa ou Sa présentaient un score de Shwachman and Kulczycki (score de sévérité clinique) plus bas que les patients infectés par les deux souches^{204,205}. Ces résultats divergents ne permettent pas de conclure sur l'impact des infections ou des co-infections par Sa ou Pa chez l'enfant²⁰⁴. Chez les patients adultes, une étude a montré que les patients infectés uniquement par Sa présentaient un VEMS plus important et moins d'exacerbations et d'hospitalisations et que les patients infectés par Pa²⁰⁶. Ils ont également mis en évidence que la co-infection Pa-Sa n'impactait pas les résultats cliniques, quel que soit le paramètre observé²⁰⁶. Ces résultats sont à modérer au regard de la différence d'âge entre les patients uniquement infectés par Sa et les patients infectés par Pa ou co-infectés.

■ 2.2.3. Résultats obtenus chez les patients de la cohorte

Les résultats cliniques des patients de la cohorte ont été évalués selon deux aspects : le pourcentage de prélèvements positifs à Sa au cours du suivi du patient et l'existence d'une colonisation chronique selon les critères définis auparavant. Il est intéressant de noter que nous avons pu identifier 17 patients co-infectés chroniquement à Sa. Comme cela a déjà été observé par Briaud P. et son équipe, nous n'avons pas pu montrer d'association entre les co-infections à Sa et l'évolution de la fonction respiratoire des patients. Cependant, si les co-infections peuvent être perçues comme délétères pour le patient, nous avons pu observer qu'il y avait plus de patients ne présentant aucune co-infection à Sa au cours du suivi de l'étude dans le groupe en déclin, sans que nous ne puissions montrer d'association statistiquement significative (Test du Chi², p-value = 0.07) (Figure 20 A et B). Nous avons également pu mettre en évidence une corrélation négative entre la survenue d'exacerbations et la colonisation chronique à Sa (Test du Chi², p-value de 0,03) (Figure 20 B).

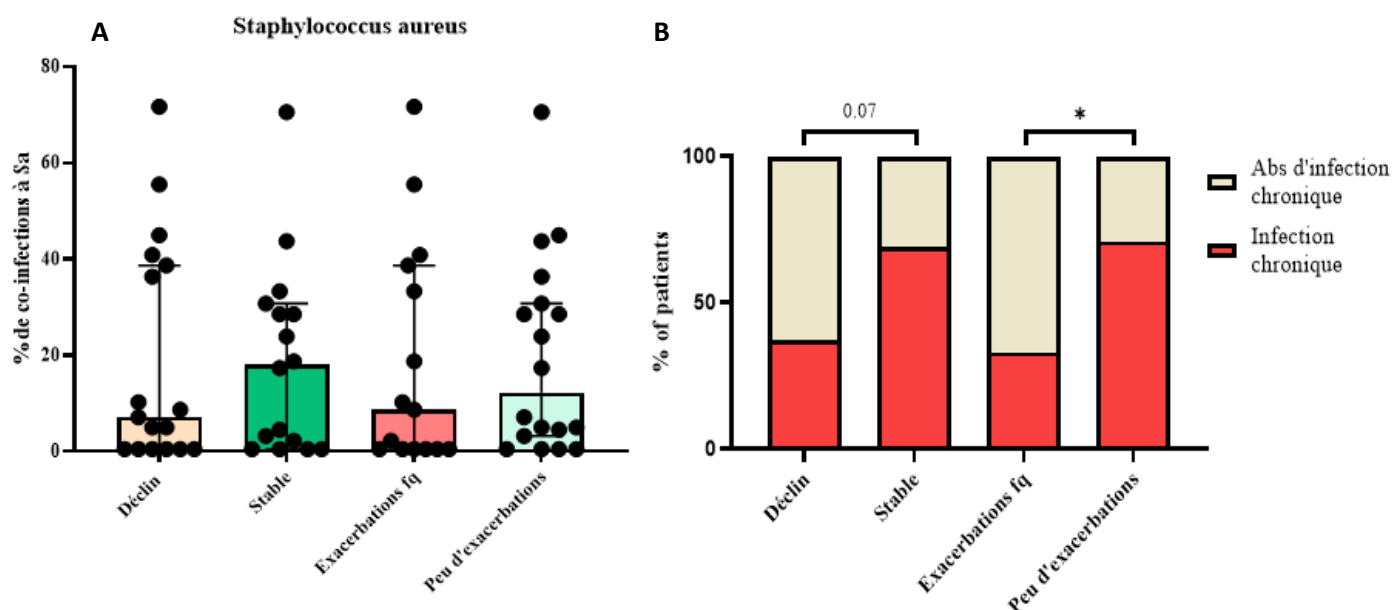
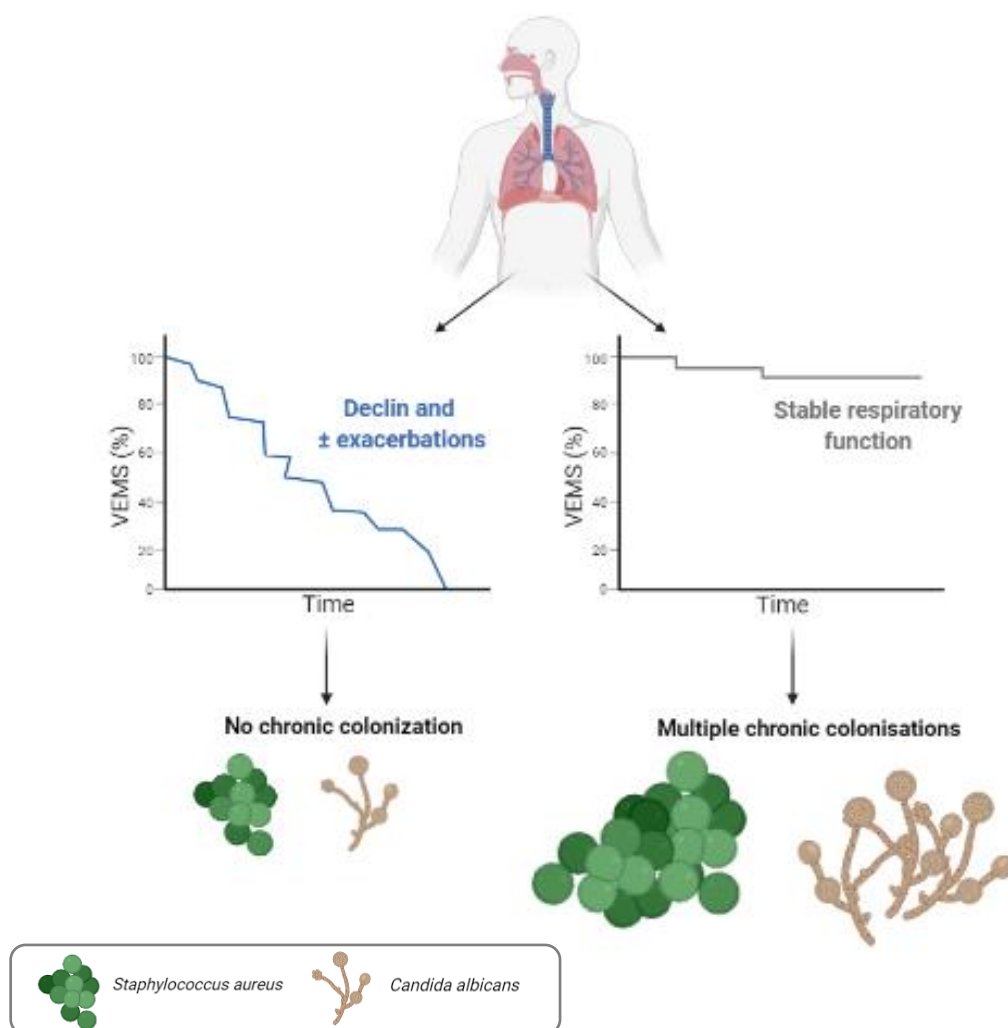


Figure 20 –Proportion de co-infections à Sa (A) et existence d’une colonisation chronique (B) chez les patients en fonction des réponses cliniques observées. Les patients ayant une altération de leur fonction respiratoire ou de nombreuses exacerbations au cours du suivi présentent moins de co-infections et de colonisations que les autres patients suggérant que celles-ci ne sont pas impliquées dans la détérioration de la fonction respiratoire.

L’absence de co-infection à Sa chez les patients présentant de nombreuses exacerbations pourrait s’expliquer par le fait que ces colonisations au long cours créent un équilibre entre différentes espèces moins propices à une instabilité de la fonction respiratoire, tel qu’on l’entend lorsque l’on parle de microbiote. Si ceci fonctionne avec les espèces bactériennes commensales considérées comme protectrices, la question peut se poser pour les espèces pathogènes²⁰⁷. Cependant comme nous l’avons discuté auparavant, les co-infections Pa-Sa ne semblent pas être délétères chez les patients adultes²⁰⁶. Il a également été mis en évidence selon les études, que les co-infections pouvaient être préjudiciables pour le patient, ou sans conséquences voir même bénéfiques, permettant le développement d’une immunité appropriée pour lutter contre le pathogène^{208,209}.

La même observation que pour Sa, a pu également être faite pour le deuxième pathogène majoritaire retrouvé chez les patients, *Candida albicans*. Le lien avec l’évolution clinique des patients pourrait être due aux mécanismes de compétition mis en place par Pa. Ces mécanismes pourraient entraîner une toxicité directe vis-à-vis du patient et des dommages tissulaires, ou pourraient signer une adaptation spécifique de Pa, qui serait plus agressive entraînant un déclin des fonctions respiratoires au cours du temps mais également plus d’exacerbations, dont Pa serait à l’origine.

En conclusion, nous avons ainsi pu observer une proportion importante de co-infection dans notre cohorte, notamment à *Staphylococcus aureus*, ou *Achromobacter xylosoxidans* et à *Candida albicans* ou *Aspergillus fumigatus* pour les co-infections fongiques. Comme il a été décrit dans la littérature, la proportion des co-infections que ce soit à Sa ou Ca diminue avec l'âge des patients, à l'exception de 3 patients de la cohorte âgés de plus de 35ans et présentant de nombreuses co-infections à Sa et Ca. Dans la majorité des cas, nous parlons de co-infections, mais il est difficile de trancher sur l'aspect chronique ou non de ces infections. Concernant Sa, nous avons trouvé une colonisation chronique pour 53% des patients. Nous avons également pu observer que les patients qui présentaient une colonisation chronique à Sa et dans une moindre mesure à Ca présentaient une fonction respiratoire stable au cours du temps et moins d'exacerbations. Ceci pourrait signer un mécanisme d'adaptation spécifique de Pa, ces souches seraient ainsi plus agressives vis-à-vis des autres pathogènes mais pourraient être également plus agressives vis-à-vis de l'hôte. La co-existence ou non avec ces différents germes pouvant entrainer une adaptation des souches de Pa, ces données seront prises en compte pour la suite des analyses.



IV. Banque de souches cliniques de Pa

1. Constitution de la banque d'isolats cliniques de Pa

Les isolats de Pa ont été recueillis à partir de différents prélèvements, expectorations ou lavages broncho alvéolaire (LBA). Au laboratoire, les souches sont identifiées de la façon suivante, brièvement, une première évaluation du morphotype est réalisée à la coloration de GRAM associée à un dénombrement semi quantitatif. Un fluidifiant est ajouté pour les expectorations. Les ensemencements sont réalisés après dilution à 10^5 pour les expectorations et à 10^3 pour les LBA. Différents types de géloses sont utilisés pour identifier tous les germes. L'isolement de Pa est permis par une gélose Cétrimide. Les géloses sont incubées pendant au maximum 5 jours à 37°C. Un dénombrement est réalisé en même temps que l'évaluation visuelle de la mucoïdie ainsi que l'identification de variants à petites colonies. Un antibiogramme est également réalisé.

Pour chaque patient inclus dans l'étude, un grand nombre d'isolats ont été initialement sélectionnés, puis après s'être assuré qu'il s'agissait bien d'un même clone ayant évolué au cours du temps, une deuxième sélection a été effectuée pour conserver les deux isolats les plus éloignés en termes de temps (figure 21). L'intervalle de temps séparant les deux isolats allait de 1,2 an à 4,7 ans avec une médiane de 3,7 ans. Il a été observé qu'un patient inclus dans l'étude était colonisé par deux clones différents, les souches Précoces et Tardives des deux clones ont été inclus dans la banque afin de pas induire de biais dans la sélection d'un des clones. Au total, 66 souches composent cette bio-banque.

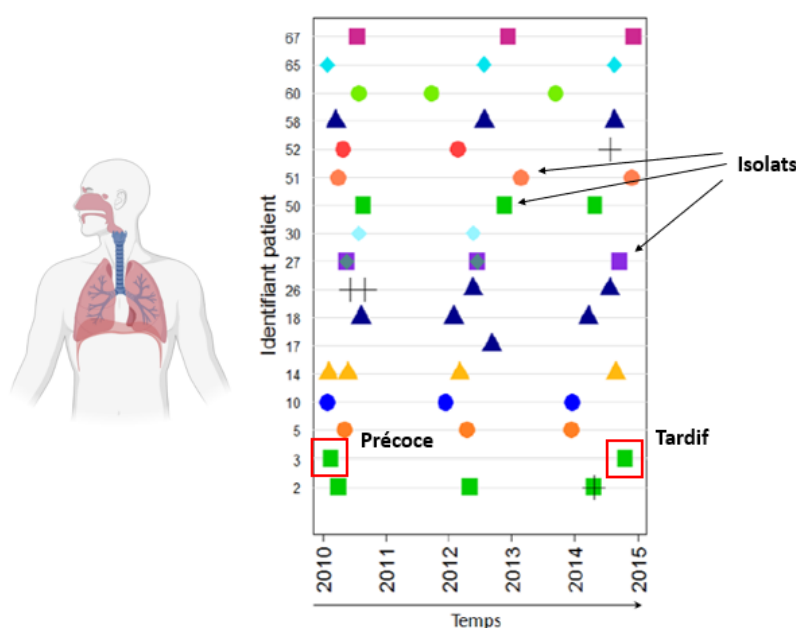


Figure 21 – Collecte de différents isolats pour chaque patient inclus dans l'étude, et sélection des isolats Précoces et Tardifs pour la constitution de la banque. Cette sélection s'est faite après vérification de la clonalité des isolats. Ce sont ensuite les isolats issus des prélèvements les plus éloignés en termes de temps qui ont été choisis pour être inclus dans la banque.

Pour s'assurer qu'il s'agissait bien de l'évolution d'un même clone au cours du temps, un génotypage par PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) ou Electrophorèse en champ pulsé a été réalisé. Cette technique de génotypage est basée sur l'analyse de la séparation de grands fragments d'ADN de 10 à 80 Kb, réalisé par des endonucléases ayant un faible nombre de sites de restriction, permettant donc une macrorestriction. Les fragments d'ADN sont ensuite séparés dans des gels d'agarose grâce à l'application de courants alternatifs. Les profils obtenus constituent ce que l'on appelle des pulsotypes. Pour être interprétable ils doivent être constitués d'au moins 10 bandes et leur interprétation est réalisée à l'aide des critères de Tenover établit en 1995²¹⁰⁻²¹²:

- Si les pulsotypes sont identiques, il s'agit de la même souche bactérienne
- S'il existe une différence de 1 à 3 bandes entre 2 pulsotypes, la parenté est probable
- S'il existe une différence de 4 à 6 bandes entre 2 pulsotypes, la parenté est possible
- Si la différence entre 2 pulsotypes est supérieure à 6 bandes, il s'agit de deux souches différentes, sans lien de parenté ou ancêtres communs.

Cette technique d'analyse possède un fort pouvoir discriminant et une grande reproductibilité, cependant elle peut manquer de standardisation si les prélèvements sont espacés dans le temps.

Ainsi, pour confirmer les résultats, une nouvelle évaluation a été réalisée sur 28 des 66 souches de la banque, en sélectionnant pour chaque clone, les isolats Précoces et Tardifs. Le typage a été réalisé par Razak Tidjani, post doctorant au sein du laboratoire, par deux techniques la MLST ou Multilocus Sequencing Typing et le Core génome. Le Core génome ou génome « cœur » correspond au génome « de base », c'est-à-dire qu'il comprend l'ensemble des gènes communs à une même espèce, il est à opposer au génome accessoire qui concerne des gènes qui peuvent varier d'un individu à l'autre et concerne souvent des avantages évolutifs comme des gènes de virulence par exemple. Le séquençage MLST est basé sur l'utilisation de gènes de ménage pour pouvoir comparer les souches entre elles. Le séquençage MLST a permis de générer un arbre phylogénétique construit par le « neighbour joining » basé sur l'alignement des séquences concaténées de 7 locus : *ascA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, *trpE* (Figure 22 A). Au total, le jeu de données contenait 9182 positions. Une correction de la distance K2P a été réalisée ainsi qu'une validation par 100 rééchantillonnages ou « bootstrap replicates ». Ceci permet de s'assurer que sur 100 évaluations, la classification obtenue est toujours la même. La barre d'échelle indique une distance de 0.2%. Les résultats mettant en évidence l'origine clonale des isolats précoces et tardifs ont été confirmés, à l'exception des souches du patient 52 (Figure 22). Nous observons également sur cet arbre que les souches appartiennent au clade des PAO1, puisque CHA fait également parti des souches de ce clade et que celles-ci « encadrent » les isolats de la banque alors que l'isolat PA14 est à une distance plus importante sur l'arbre. Une deuxième analyse a généré un arbre phylogénomique, confirmant ces résultats par le séquençage « core genome » (Figure 22 B).

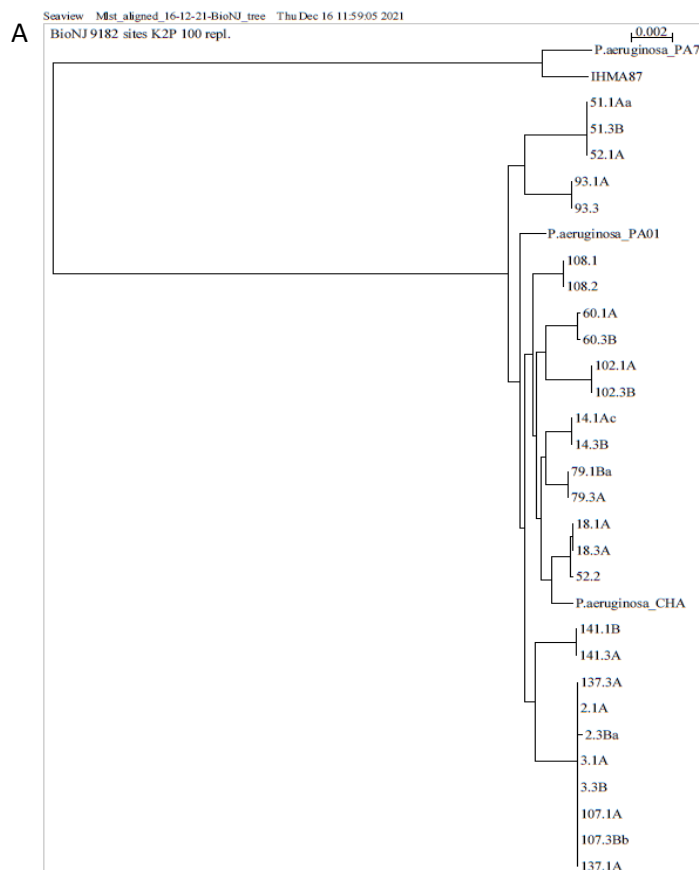
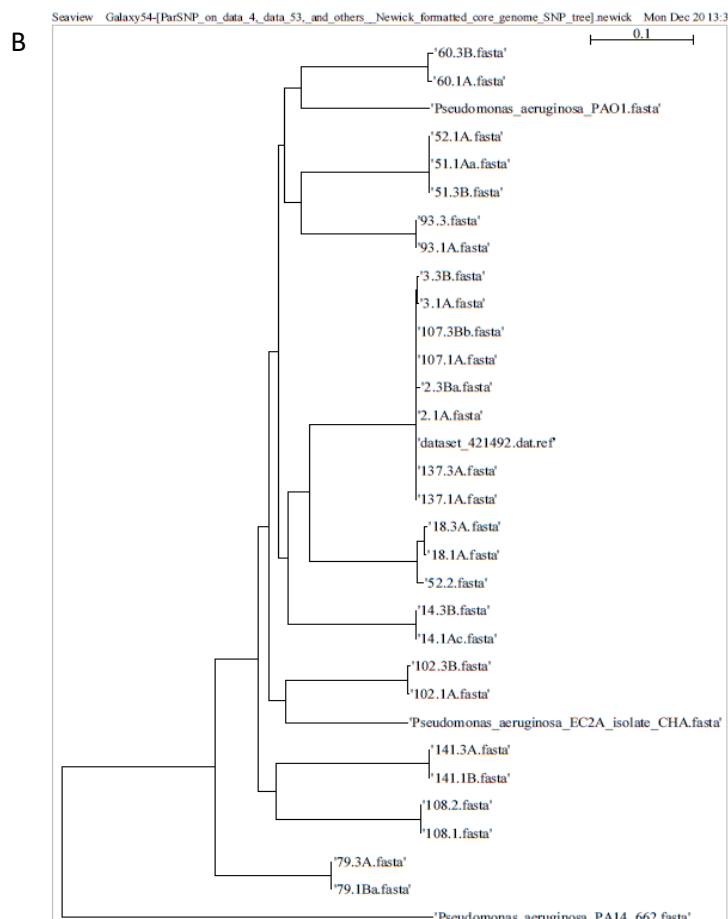


Figure 22 :

Validation de la clonalité des isolats de la banque par génération d'un arbre phylogénétique basé sur un séquençage MLST (A) ou du core génome (B)

Les isolats sont identifiés comme ceci : le numéro correspond au numéro attribué à chaque patient, puis les chiffres 1, 2, 3 correspondent au point temporel : début, milieu et fin, puis la lettre correspond à une bactérie au sein du prélèvement.

PAO1, PA14, PA7, ISHMA87 et la souche CHA sont des souches de laboratoire.



2. Caractérisation phénotypique des souches de la banque.

➤ 2.1. Matériel et Méthode

Les souches de la banque ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique au cours de la thèse d'O. Moyne³³. Les résultats présentés par la suite sont ceux auxquels j'ai participé, ainsi que ceux que nous réutilisons pour conduire une nouvelle évaluation globale des souches en termes d'expression de facteurs de virulence, à savoir la cytotoxicité induite sur cellule J774 et A549 qui sont respectivement, des lignées de macrophages et de cellules épithéliales pulmonaires. Au total nous évaluerons la virulence des souches sur les aspects suivants : mucoïdie et capacité à produire des pigments dans différents milieux, cytotoxicité vis-à-vis de cellules immunitaires (macrophages et CD) et épithéliales, ainsi que la capacité de la souche à croître dans le milieu.

La caractérisation de la production de mucus et de pigments a été évaluée sur géloses SCFM (Synthetic Cystic Fibrosis Medium) et sur géloses PIA. Le milieu PIA, ou *Pseudomonas Isolation Agar* est un milieu dérivé du milieu King A, spécifique de l'isolement des souches de type *Pseudomonas* et la mise en évidence du sous type *aeruginosa*, par la production de pyocyanine. Il contient de l'Irgasan, un antibiotique à large spectre qui agit contre l'Enoyl-[Acyl Carrier Protein] réductase, enzyme impliquée dans la synthèse des acides gras et qui est inefficace contre le genre *Pseudomonas*. La composition du milieu PIA (Difco™ *Pseudomonas Isolation Agar*, BD) est détaillée dans le tableau V et celle du milieu SCFM dans le tableau IX. Afin d'évaluer la mucoïdie et la production de pigments par les souches, celles-ci ont été cultivées en milieu liquide puis étalées sur géloses SCFM ou PIA afin d'évaluer l'aspect des colonies : sec ou mucoïde et la couleur du milieu après 48h à 37°C. Cette analyse a été réalisée sur l'ensemble des souches de la banque.

Tableau V : Composition du milieu de culture PIA (BD)

Réactif	Concentration	Intérêt
Peptone	20g/L	Source de carbone nécessaire à la croissance bactérienne
Chlorure de magnésium	1,4g/L	Favorise la production de pyocyanine
Sulfate de Potassium	10g/L	
Irgasan	25mg/L	Antibiotique, sélection des bactéries <i>Pseudomonas spp.</i>
Agar	13,6g/L	Gélifiant
Glycérol	20ml/L	Source d'énergie, favorise la production de pigments

La caractérisation de la cytotoxicité des souches vis-à-vis des lignées de cellules épithéliales (A549) ou macrophagiques (J774) a été évaluée de la façon suivante, les cellules ont été mises en contact avec les bactéries à un rapport de 10 bactéries pour une cellule. La mortalité a été suivie par microscopie en fonction de l'incorporation d'iodure de propidium marquant les cellules dont la membrane était lésée.

Concernant la cytotoxicité vis-à-vis des CD, nous avons cherché à analyser la cytotoxicité qui pouvait être médiée par les molécules excrétées par les bactéries et qui seraient alors contenues dans les surnageants (SN) de culture. Pour cela, les CD ont été placées en plaque 6 puits à une concentration de 1 million/ml et 2ml/puit en milieu de culture RPMI 10%SVF. Les CD ont été activées par LPS (1µg/ml) et 100µl de SN préalablement déprotéinisés ont été ajoutés. Pour définir une souche comme cytotoxique vis-à-vis des CD nous avons évalué la mortalité induite par cytométrie en flux (CMF) selon l'expression d'un marqueur de viabilité cellulaire (LiveDead™ BD), sur deux expérimentations indépendantes. Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport à la mortalité induite par le LPS seul afin d'identifier la surmortalité liée aux molécules contenues dans les surnageants. Pour s'affranchir de la mortalité inhérente à l'activation cellulaire, nous avons défini un seuil à 30% de toxicité supplémentaire que le LPS seul pour définir une souche comme cytotoxique vis-à-vis de la CD. La caractérisation des métabolites responsables de cette surmortalité a été réalisée par métabolomique.

➤ 2.2. Résultats

▪ 2.2.1. Evaluation de la mucoïdie des isolats de la banque

La production de mucus est un des mécanismes de défense mis en place par Pa pour faire face au système immunitaire et persister chez l'hôte¹⁰⁶. Nous observons que la moitié des isolats Précoces produisent du mucus alors que cette proportion diminue à 26% pour les isolats Tardifs (Figure 23). L'évolution de la mucoïdie a été évaluée par clone et nous avons pu montrer que pour 60% des souches, le phénotype ne variait pas au cours du temps. Nous avons une augmentation de la capacité à produire du mucus dans seulement 7% des cas et une perte de cette capacité pour 33% des clones. La perte du phénotype mucoïde pour les isolats Tardifs, mise en évidence de manière statistiquement significative est contraire aux résultats présentés dans la littérature (p-value < 0.05, test du Chi²). Ces résultats divergents peuvent s'expliquer par la sélection de patients plus âgés que ceux inclus dans de précédentes études (> 18ans) avec une durée de l'infection plus ancienne. Ainsi, la transition mucoïde pourrait être un état momentané facilitant l'adaptation et la persistance de la souche chez l'hôte. Cette hypothèse est soutenue par l'étude de Marvig et de son équipe qui ont conduit une étude génomique sur 36 clones bactériens recueillis de façon longitudinale chez des patients atteints de mucoviscidose pour un total de 474 isolats recueillis de façon longitudinale. Ils ont montré que les bactéries produisaient du mucus de façon précoce mais que la survenue d'autres mutations inversait ce phénotype consommateur d'énergie en faveur d'autres mécanismes impliqués dans la réponse au stress¹⁶⁹.

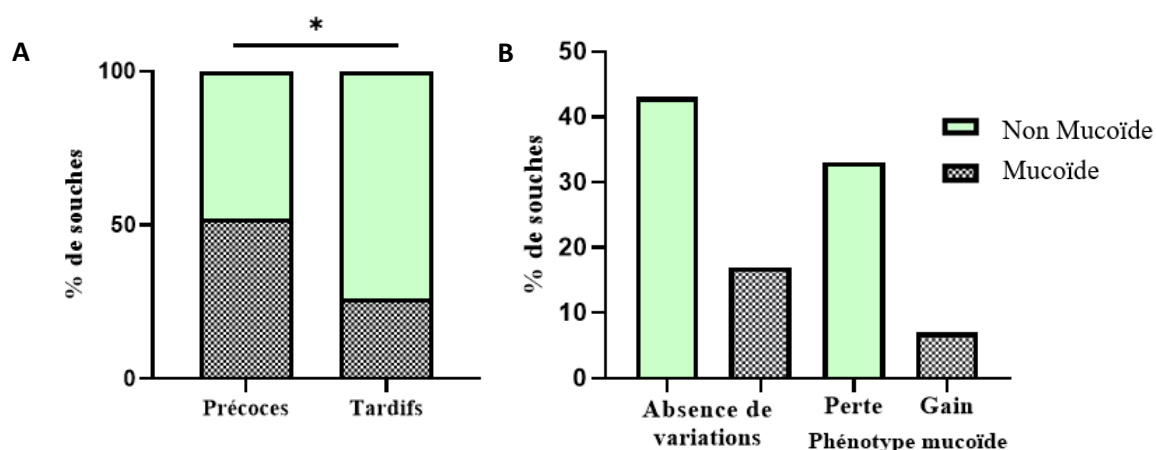


Figure 23 – Evaluation de la mucoidie des isolats de la banque (A) et de l'évolution du statut mucoïde au cours du temps (B). Une plus grande proportion d'isolats mucoïdes a été observée parmi les isolats Précoces par rapport aux isolats Tardifs. La majorité des isolats n'ont pas présenté de variation de leur phénotype entre les deux prélèvements. Lorsque celui-ci évolué, il s'agissait majoritairement d'une perte de la capacité à produire du mucus. (* : p-value < 0.05)

2.2.2. Production de pigments

Les résultats observés concernant la production des pigments étaient différents entre les deux milieux, les isolats Précoces produisent plus de pigments sur géloses PIA que sur gélose SCFM, 75% contre 48%, respectivement (Figure 24A). Les variations observées peuvent être dues à la composition des milieux. Le milieu PIA favorise la production de Pyocyanine par Pa par son enrichissement en glycérol, source d'énergie nécessaire à la production de pigments mais surtout à la présence de Chlorure de Magnésium et de Sulfate de Potassium. Les deux derniers composants sont également présents dans le SCFM (Tableau IX), cependant il n'y a pas de glycérol comme source d'énergie. Les observations faites pour les isolat Précoces ne sont pas vérifiées pour les isolats Tardifs, avec une plus grande proportion de souches productrices de pigments sur gélose SCFM par rapport à la gélose PIA (57% contre 47% respectivement) (Figure 24A).

Si l'on confronte ces résultats au type de pigments produits, nous avons montré que sur gélose SCFM, les souches produisent majoritairement de la Pyoverdine (69% et 58% pour les isolats Précoces et Tardifs, respectivement), alors que sur gélose PIA nous observons une majorité de Pyorubine (43% et 50% pour les isolats Précoces et Tardifs, respectivement) (Figure 24B). La production de Pyoverdine par un grand nombre de souches est attendu et décrit dans la littérature. Nous observons une diminution de la production de Pyoverdine au cours du temps, ce pigment ayant une forte affinité pour le fer (supérieure à celle de Pyocyanine), il est principalement mis en jeu dans la phase aiguë de l'infection^{213,214} (Figure 24B). La production de taux élevés de Pyorubine sur gélose PIA n'était à l'inverse pas attendue. Ce terme de Pyorubine peut faire référence à différents sous types de sidérophores de couleur rouge²¹⁵. Si la production est souvent mentionnée, très peu de bibliographie sur ce sujet est disponible²¹⁵. Une étude de cas a cependant mis en évidence

un phénotype inhabituel de souches mucoïdes produisant des taux élevés de Pyorubine et de Pyocyanine, prélevées de façon longitudinales chez un patient adulte. Ce phénotype a été corrélé aux périodes d'exacerbations²¹⁶. Nous pouvons observer une légère augmentation de sa production sur gélose PIA entre les isolats Précoces et Tardifs (Figure 24B), ceci est cohérent avec les propriétés qui ont été décrites pour ce pigment à savoir une activité antibactérienne et la capacité à lutter contre le stress oxydatif^{217 218}. Il est intéressant de noter que la Pyocyanine, de couleur bleu, peut également être rouge en milieu acide. Nous pouvons donc nous demander si une proportion importante de bactéries ou la production de certains composés ne pourraient pas être à l'origine d'une acidification importante de la gélose, entraînant l'observation d'une augmentation de la production de pigments rouges²¹⁹. La production de Pyocyanine semble relativement stable dans le temps. Si certaines études ont montré que ce pigment pouvait être nécessaire au cours de la phase aigüe de l'infection, il a surtout été décrit comme étant nécessaire à la persistance chez le patient notamment de par ses propriétés antibactériennes et antifongiques²²⁰⁻²²² (Figure 24B).

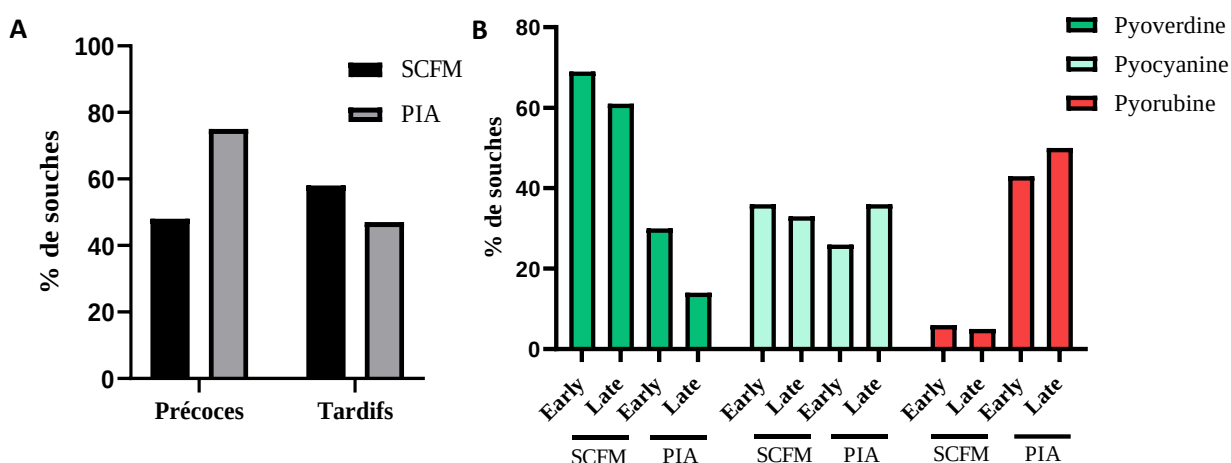


Figure 24 - Evaluation de la production de pigments par les souches cliniques de la banque. La comparaison de la production de pigments entre les isolats Précoces et Tardifs de PA sur deux milieux de culture différents, milieu SCFM ou PIA (A), a montré une modification de leur comportement selon le milieu dans lequel elles se trouvent. De la même façon, l'évaluation du type de pigment produit par les isolats dépend du milieu de culture et présente peu de variation entre les isolats Précoces (Early) et Tardifs (Late) (B).

La comparaison de ces deux milieux nous permet de nous rendre compte de la capacité globale de la souche à produire des pigments. Au cours de la culture liquide, nous avons pu observer des résultats similaires à ceux observés sur SCFM solide concernant la Pyorubine, puisqu'un clone produit des taux élevés de ce pigment. Nous observons également une forte production de Pyocyanine. Aucune corrélation (positive ou négative) n'a été mise en évidence entre la production de mucus et la production de pigments, que ce soit sur gélose PIA ou SCFM.

■ 2.2.3. Cytotoxicité induite sur cellules dendritiques

La cytotoxicité vis-à-vis de deux lignées cellulaires avait été évaluée au cours des travaux de thèse d'O. Moyne, les cellules J774, une lignée de macrophages murins et les A549, une lignée de cellules épithéliales alvéolaires humaine. Cette cytotoxicité est médiée par certains facteurs de virulence produits par Pa, comme la production d'exotoxines ou la présence du SST3. Ainsi, 52% des souches étaient cytotoxiques vis-à-vis des cellules J774 et 35% vis-à-vis des cellules A549³³. Dans la majorité des cas la cytotoxicité vis-à-vis des 2 types de cellules n'a pas variée entre l'isolat Précoce et Tardif.

Cette analyse a été complétée par l'évaluation de la cytotoxicité des souches vis-à-vis des CD médiée par les molécules excrétées par les bactéries et présentes dans les surnageants (SN) de culture. Ceci ne prend pas en compte l'ensemble des facteurs de virulence de la bactérie, comme par exemple, la cytotoxicité médiée par le SST3 lors d'un contact cellule à cellule, mais a pu être observé lors de la culture des souches en présence des SN de culture. Une certaine mortalité est induite après activation des cellules par l'ajout d'un TLRL, le LPS. Cependant certains SN induisaient une surmortalité, quand d'autres présentaient un effet protecteur, et ceci quel que soit l'effet sur l'activation et la maturation de la CD que l'on pouvait observer par ailleurs. Pour ne pas biaiser notre analyse, les SN avaient été déprotéinisés afin d'éliminer les TLR ligands qui pourraient être contenus dedans comme la flagelline, ou d'autres protéines qui pourraient induire une cytotoxicité sur les CD comme les toxines bactériennes. Ces analyses nous ont permis d'identifier 25 souches (38%) produisant des molécules (ou métabolites) entraînant une surmortalité sur la CD.

➤ 2.3. Evaluation de la virulence globale des souches

Les caractéristiques des souches de la banque ainsi que l'expression des différents facteurs de virulence qui ont été évalués, sont récapitulés dans le tableau IV.

Les différents facteurs de virulence que nous avons identifiés ne sont pas présents ou exprimés par tous les isolats et constituent ainsi différents degrés de virulence, mais également différentes stratégies de virulence mises en place par les souches de Pa pour persister chez l'hôte. Cette virulence peut modifier la prolifération bactérienne ainsi que son impact sur l'environnement pulmonaire des patients, entraînant différentes conséquences sur l'évolution de la fonction respiratoire des patients au cours du temps.

Tableau VI : Récapitulatif des caractéristiques phénotypiques des souches de la banque.

		N	%
Mucoïdie		26	40%
Production de pigments – SCFM (58%)	Pyoverdine	22	33%
	Pyocyanine	14	17%
	Pyorubine	2	3%
Production de pigments – PIA (59%)	Pyoverdine	9	14%
	Pyocyanine	11	17%
	Pyorubine	17	26%
Cytotoxicité	J774	34	52%
	A549	23	35%
	CD	25	38%
Croissance	Faible	24	36%
	Modérée	26	39%
	Forte	14	21%

■ 2.3.1. Matériel et méthode

Afin de caractériser les différents degrés de virulence des souches et les facteurs de virulence associés permettant de les discriminer, des analyses multivariées ont été réalisées par R studio (version 4.0.2). Les différentes analyses effectuées sont représentées sur la figure 65 du chapitre III car il s'agit d'analyses statistiques qui sont couramment utilisées pour les analyses de métabolomique. Tout d'abord, la répartition des isolats est représentée par la réalisation d'une analyse en composante principale (ACP), analyse non supervisée, afin d'identifier les paramètres qui les caractérisent. Nous avons ensuite évalué comment les facteurs de virulence étaient associés entre eux, c'est-à-dire quels étaient les paramètres exprimés simultanément par les souches et quels étaient les paramètres qui étaient au contraire exclusifs les uns des autres. Pour cela nous avons réalisé des tests de corrélation. Enfin, pour définir les différents types de virulence des souches, nous avons regroupés celles qui partageaient des caractéristiques communes par la réalisation d'une clusterisation à l'aide d'une approche nommée Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) sur R studio puis nous avons validé cette répartition en utilisant une deuxième représentation sous la forme d'un dendrogramme généré par l'algorithme des Kmeans.

2.3.2. Résultats

Les souches sont donc réparties en fonction des différents facteurs de virulence qu'elles expriment sur une représentation ACP (Figure 25 A). L'organisation des différents facteurs de virulence est représentée sur la figure 25 B. Ceci nous permet d'observer que la production de mucus est un paramètre retrouvé de façon assez isolée. Il est à cependant à noter que les souches mucoïdes présenteront une croissance moindre, une cytotoxicité plus faible, ainsi qu'une faible production de pigments en milieu SCFM. A l'inverse, la cytotoxicité médiée par la bactérie sur les deux types de lignées de cellules (A549 et J774) est corrélée et elle est associée à une forte croissance de la souche. La cytotoxicité vis-à-vis des CD médiée par les molécules contenues dans la SN n'est pas associée aux autres cytotoxicités et ce paramètre est retrouvé de façon isolée. Celle-ci ne semble donc pas être due à la production de pigments qui ont également pu être décrits comme ayant une activité lytique²²³. Les différences de cytotoxicités observées sont dues aux différents facteurs de virulence mis en place dans chacune des approches : d'un côté toxicités directes et notamment par un contact cellules à cellules par le SST3 et l'injection de toxines au niveau intracellulaire potentielle, et de l'autre côté une toxicité indirecte médiée par éléments solubles excrétés dans le SN. Ceci met en évidence que les bactéries de la banque ont développé différentes stratégies d'adaptation pour persister chez l'hôte.

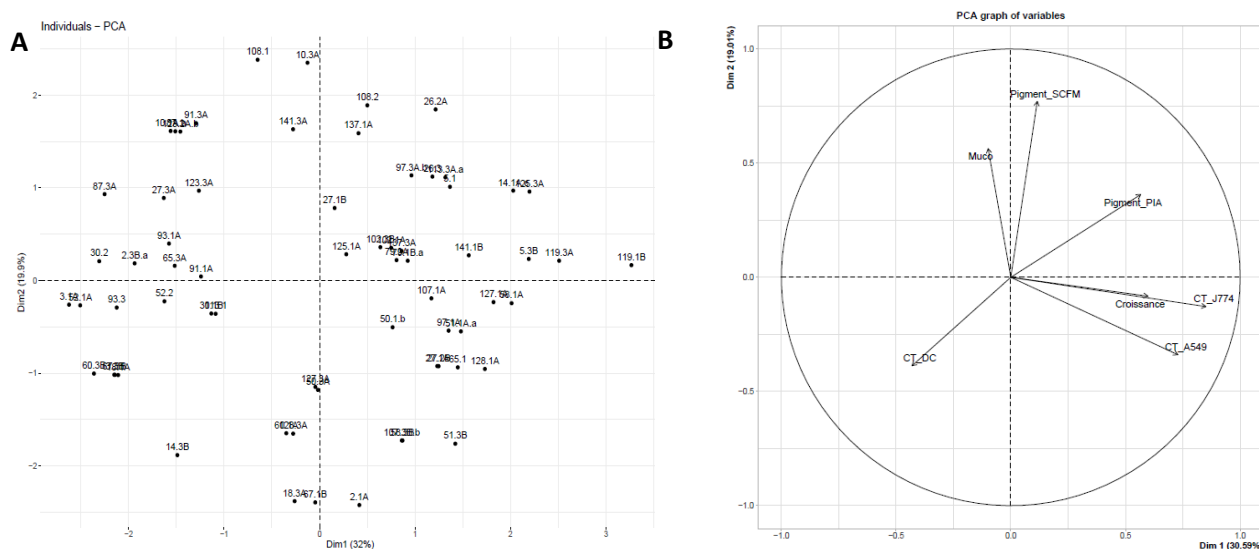


Figure 25 - Représentation de la répartition des souches en ACP sur les différentes composantes (A), en fonction de l'expression de facteurs de virulence, représentés explicitement sur la figure B. La cytotoxicité des souches vis-à-vis des lignées A549 et J774 est associée à une croissance bactérienne forte et à une faible production de mucus. A l'inverse les souches mucoïdes vont produire plus de pigments en milieu SCFM. La cytotoxicité médiée par les métabolites excrétés n'est pas due à la production de pigments par les souches.

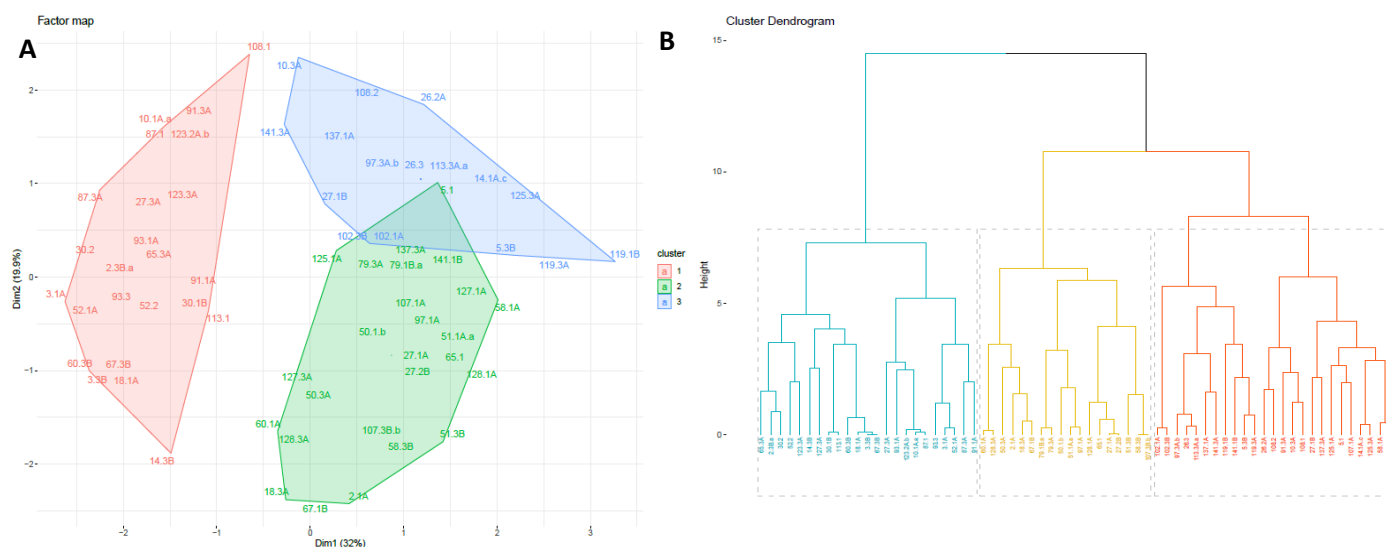


Figure 26 - Représentation des différents degrés de corrélation dans l'expression des facteurs de virulence par les souches de Pa. Le bleu est associé aux variables corrélées et le rouge aux variables non corrélées. La croissance a été évaluée sur milieu de culture SCFM. (« Muco » : correspond à la production de mucus par les souches, la production de pigments a été évaluée sur milieu PIA ou SCFM, CT : correspond à la cytotoxicité évaluée sur la lignée de macrophages : J774, de cellules dendritiques : DC ou de cellules épithéliales respiratoires : A549).

L'expression différentielle de ces paramètres permet de définir différents niveaux de virulence des souches. Nous avons ainsi pu définir trois groupes de souches distincts :

- Le premier cluster est défini par une forte toxicité sur les CD et par la production de mucus.
- Le deuxième cluster est défini par une cytotoxicité vis-à-vis des lignées de cellules épithéliales alvéolaires et de macrophages mais également par l'absence de production de pigments en milieu SCFM.
- Enfin le troisième cluster se caractérise par une production d'un taux élevé de pigments, quel que soit le milieu, ainsi qu'une capacité de croissance marquée.

Une séparation marquée de 32% a pu être observée sur la première composante et de près de 20% sur la deuxième. En effet, nous pouvons considérer que cette séparation est significative à partir d'un score de 20%. Nous pouvons ainsi observer que dans cette clusterisation, aucun des groupes ne peut être défini comme « non virulent », chaque groupe présente une stratégie qui lui est propre pour persister chez le patient.



2.3.3. Impact de la virulence sur l'évolution de l'état de santé respiratoire.

Le phénotype des souches et leur virulence globale, médiée par les différents paramètres que nous avons caractérisés, pourrait être responsable des différentes réponses cliniques observées sur la cohorte des patients. Nous avons donc évalué l'association entre les différents paramètres cliniques, à savoir l'instabilité de la fonction respiratoire des patients et l'évolution au cours du temps avec les phénotypes de virulence. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation, les différents phénotypes des isolats participant, mais ne semblent pas être responsables de l'état de santé respiratoires observé chez les patients de la cohorte. Dans la suite de l'étude nous allons investiguer d'autres mécanismes mis en place par la bactérie pour persister chez l'hôte.

En conclusion, nous avons pu observer que les souches de la banque produisaient différents types de pigments et que ceux-ci variaient en fonction du milieu de croissance utilisé. La production de pyoverdine et de pyocyanine a été retrouvée chez une majorité des souches de la banque. De façon étonnante, une production de pyorubine a été décrite également chez un grand nombre de souches sur gélose PIA. La production de Pyoverdine diminue entre les isolats Précoces et Tardifs alors que la production de Pyocyanine reste stable dans le temps. Nous avons également pu montrer que moins de la moitié des souches responsables d'infection chronique produisaient du mucus. Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, les souches de la banque ont eu tendance à perdre leur phénotype mucoïde. Nous avons pu observer que les souches pouvaient induire différents types de cytotoxicité sur les cellules immunitaires et les cellules épithéliales. La cytotoxicité pouvait être médiée par des mécanismes de type contact cellules à cellules par l'expression du SST3 et la production de cytokines mais également par des métabolites excrétés par la bactérie que nous chercherons à caractériser dans le chapitre III. Ces différents éléments ont été pris en compte afin de déterminer la virulence globale des souches par une analyse multivariée qui a permis de mettre en évidence 3 types de virulence :

- Des bactéries produisant fortement du mucus et responsables d'une forte toxicité sur les CD médiée par l'excrétion de métabolites.
- Une forte production de pigments quels que soit le milieu.
- Ou une cytotoxicité vis-à-vis des lignées de cellules macrophagiques et épithéliales ainsi qu'une croissance rapide.

3. Mises au point de la culture des souches

Pour analyser l'exométabolome des souches cliniques et identifier de potentiels métabolites immunomodulateurs, nous avons cultivé les souches en milieu liquide afin de collecter les SN. Nous avons ainsi dû identifier les conditions optimales de culture, nécessaire à une évaluation des propriétés immunologique *in vitro* et des métabolites excrétés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, passant par la sélection d'un milieu de culture et une phase de croissance adapté. Les objectifs de cette partie du travail sont comme nous l'avons présenté :

- L'évaluation de la production de métabolites immunomodulateurs **par le test immunologique *in vitro*.**
- Et une caractérisation fine des métabolites excrétés par **métabolomique.**

Le choix du milieu de culture des souches est donc primordial pour permettre une caractérisation par les deux approches, qui présentent pourtant des contraintes tout à fait différentes. Différents milieux de culture ont alors été évalué ainsi que différentes phases de la courbe de croissance.

➤ 3.1. Choix du milieu de culture des souches.

L'environnement dans lequel la souche évolue, a une importance majeure sur son métabolisme et son évolution ^{224,225}. Nous avons ainsi cherché à conserver au maximum les conditions naturelles de croissance de la bactérie en prenant en compte certaines contraintes inhérentes à la réalisation de nos tests. A savoir, des ressources abondantes pour que la bactérie n'ait pas besoin de restreindre la production de métabolites secondaires pouvant présenter des propriétés immunomodulatrices. Et d'autre part, des ressources suffisamment pauvres pour que nous puissions évaluer cette production sans être contraints par la matrice environnante.

▪ 3.1.1. Présentation des milieux de culture à l'étude

Différents milieux de culture ont donc été évalués pour la croissance des souches :

- Le LB (Lysogeny Broth ou Luria Bertani) :

Le milieu LB est un milieu de culture aussi bien pour les cultures liquides que solides ²²⁶. C'est un milieu riche, non sélectif, qui permet de faire pousser toutes les bactéries non exigeantes, c'est-à-dire toutes les bactéries qui ne nécessitent pas la présence de facteurs de croissance particuliers pour se développer. Différentes formules existent en fonction de la concentration en sels, ainsi nous avons utilisé un milieu LB-Miller (contenant 10g/L de NaCl), les milieu LB-Lennox et LB-Luria contenant respectivement 0,5 et 5g/L de NaCl étant destiné à la culture de bactéries en présence d'antibiotiques sensibles aux sels. La composition du milieu LB (LB Broth Miller, AthenaEST™) utilisé est présentée dans le tableau VII, sans que la concentration de chaque constituant ne soit détaillée, notamment en ce qui concerne les peptones qui sont des sources

d'acides aminés et d'énergie (carbone et azote notamment). L'absence de caractérisation précise pose problème pour s'affranchir de la matrice lorsque l'on analyse les métabolites consommés ou excrétés.

Tableau VII : Composition du milieu LB.

Réactif	Concentration
Peptone	10g/L
Extrait de levure	5g/L
Chlorure de sodium	10g/L

▪ Le milieu M9 ou milieu « minimum » :

Ce milieu est recommandé notamment pour l'étude par métabolomique des bactéries. Le M9 est pauvre en nutriments par rapport aux autres milieux de culture, ceci va forcer la bactérie à utiliser au maximum ses propres voies de synthèse pour se développer et pour favoriser l'évaluation de la consommation / production des métabolites dans le milieu. Nous avons utilisé un milieu M9 comportant les composants de base (Salts Medium 5X, Sigma) et enrichi pour la culture des isolats de *P. aeruginosa* (Tableau VIII) :

Tableau VIII : Composition du milieu M9 optimisé pour la culture de *P. aeruginosa*.

	Réactif	Concentration	
M9 Salts Medium 5X Sigma	Disodium Phosphate - Na_2PO_3 anhydre	33,9g/L	/
	Phosphate de potassium - KPO_3	15g/L	/
	Chlorure de sodium – NaCl	2,5g/L	/
	Chlorure d'ammonium - NH_4Cl	5g/L	/
Complément	Extrait de levure synthétique	1g/L	/
	Tryptophane	0,2g/L	1 mmol/L
	Glucose	2,5g/L	14 mmol/L
	Glycérol	1%	/
	Sulfate de fer - FeSO_4	0,4g/L	/
	Acide citrique – $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	0,36g/L	2 mmol/L
	Sulfate de Magnésium - MgSO_4	50mg/L	1mmol/L
	Sulfate de Calcium - CaSO_4	50mg/L	1mmol/L

▪ Le milieu SCFM ou Synthetic Cystic Fibrosis Sputum Medium :

Le SCFM est un milieu qui reproduit l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose. C'est un environnement de choix pour être au plus près des conditions physiologiques de développement des isolats cliniques de *P. aeruginosa* et ainsi de minimiser le

risque que la souche ne s'adapte et utilise d'autres voies métaboliques que celles habituellement utilisées chez le patient. Kumar B. a notamment montré l'impact de l'environnement sur le métabolisme des bactéries et notamment sur la capacité de *Burkholderia cenocepacia*, souche co-infectant les patients atteints de mucoviscidose, à croître et à synthétiser la flagelline²²⁷. Toujours dans l'étude de *Burkholderia cenocepacia*, il a été mis en évidence que les métabolites excrétés variaient en fonction du milieu de culture SCFM ou LB, notamment la production de sidérophores, de peptides anti microbiens, de molécules du QS, molécules présentant un intérêt majeur également chez Pa²²⁸. Dans le cadre de l'infection à Pa, Colmer-Hamood Ja. a souligné l'importance du choix du milieu de culture dans les modèles *ex-vivo* pour être au plus près de l'environnement naturel de la bactérie, afin d'identifier les paramètres mis en jeu dans la pathogénicité de la bactérie²²⁹. En effet, certaines études montrent que le phénotype des souches de Pa est similaire dans les expectorats des patients atteints de mucoviscidose ou en SCFM et que leur comportement va dépendre de l'environnement nutritionnel et notamment de la présence de certains acides aminés aromatiques. Ainsi, en milieu SCFM la production de pyocyanine ou de molécules du QS est favorisée alors que l'expression de certains gènes impliqués dans le catabolisme des acides aminés aromatiques et de la flagelline était réprimée²²⁴. Ce milieu, dont la composition est présentée dans le tableau IX correspond au milieu SCFM classique mais sans mucine afin de pouvoir suivre la croissance de la souche par la densité optique (DO)²³⁰.

Tableau IX : Composition du milieu de culture SCFM (tableau extrait de la thèse d'O. Moyne)

Composé		Concentration (mM)	Composé		Concentration (mM)
Acides aminés	L-Ser	1,5	Sels	NaH ₂ PO ₄	1,3
	L-Glu *	1,5		Na ₂ HPO ₄	1,3
	L-Pro	1,7		KNO ₃	0,35
	Gly	1,2		K ₂ SO ₄	0,27
	L-Ala	1,8		NH ₄ Cl	2,3
	L-Val	1,1		KCl	14,9
	L-Met	0,6		NaCl	51,8
	L-Ile	1,1		CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,8
	L-Leu	1,6		MgCl ₂ * 6H ₂ O	0,61
	L-Orn * HCl	0,68		FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,0036
	L-Lys * HCl	2,1	Tampon	MOPS	10
	L-Arg * HCl	0,31		D-glucose	3
	L-Trp	0,01	Sources de carbone	L-lactic acid	9,3
	L-Asp	0,83		N-acetyl-D-glucosamine	0,3
	L-Tyr	0,80		1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)	100 µg/mL
	L-Thr	1,1		ADN de sperme de saumon	0,6 g/mL
	L-Cys *	0,16			
	L-Phe	0,53			
	L-His * HCl	0,52			

- 3.1.2. Evaluation de différents milieux permettant la mise en évidence des différentes propriétés immunomodulatrices des souches cliniques.

Nous avons tout d'abord cherché à identifier quel était le milieu qui permettait le mieux d'étudier la production de métabolites présentant des propriétés immunomodulatrices.

- 3.1.2.1. Matériel et Méthode

Pour cela, nous avons sélectionné les isolats Précoces et Tardifs d'une souche de la banque prélevés chez le patient 14, qui pouvaient présenter un intérêt dans cette caractérisation. Les isolats présentaient tout d'abord différents types de facteurs de virulence, l'isolat Précoce produisait fortement des pigments, ainsi qu'une cytotoxicité plus importante sur les lignées J774 et A549, par rapport à l'isolat Tardif qui entraînait une forte cytotoxicité vis-à-vis des CD, médiée par la production de métabolites. De plus, la caractérisation de l'endométabolome des souches effectuée au cours d'un précédent travail a montré que les deux isolats présentaient des différences marquées et appartenaient à deux métabotypes différents, suggérant des modulations qui pourraient être différentes en fonction de l'isolat.

Dans cette première approche, les isolats Précoces et Tardifs ont été cultivés en milieu liquide M9, SCFM et LB. Les SN ont été collectés à différents points de la courbe de croissance : au début, au milieu et à la fin de la phase exponentielle de croissance suivi par la valeur de la densité optique (DO) afin de ne pas induire de biais sur ce point qui n'avait pas encore été évalué. L'impact de l'immunomodulation induite par les SN a ensuite été évalué par un test immunologique *in vitro* mis au point et détaillé plus particulièrement au cours du chapitre II. Le test immunologique *in vitro*, consiste en la culture de CD en plaque 6 puits, à une concentration de 1×10^6 cellules/ml par puits contenant 2ml de milieu AIMV. Les CD sont activés par ajout d'un TLRL, le LPS (1µg/ml) puis les SN de culture des souches sont ajoutés à raison de 100µl de SN pour 1ml de culture de CD. Cette analyse nécessite au préalable une étape de déprotéinisation des SN afin d'éliminer l'ensemble des TLRL qui pourraient entraîner une surstimulation de la CD. Après 36h de culture, l'activation et la maturation des CD sont évaluées par CMF en fonction de l'expression de différents marqueurs membranaires : le CMHII qui permet d'évaluer l'activation de la CD ainsi que des marqueurs de co-activation le CD40 et le CD86 et de co-inhibition : PD-L1 et PD-L2. Les résultats obtenus sont normalisés par l'expression de chaque marqueur en condition d'activation par le LPS seul.

- 3.1.2.2. Résultats et sélection du milieu de culture adapté

Nous avons pu observer une variation significative de l'expression de l'ensemble des marqueurs membranaires induite par les SN de culture des souches cultivées dans les différents milieux (analyse ANOVA, test de Kruskal-Wallis (p-value < 0.05)). Les milieux qui permettent

d'observer une variation significative de l'activation et de la maturation de la CD en présence des SN de culture par rapport à la condition LPS seul, sont les milieux SCFM et LB (Figure 31). Le milieu M9 permet à la bactérie d'assurer sa survie et sa croissance mais pourrait ne pas lui permettre d'utiliser certaines voies métaboliques nécessaires à la production de métabolites ayant des propriétés immunomodulatrices. Ce milieu ne peut donc pas être sélectionné pour notre étude. Entre le milieu LB et le SCFM, nous observons que l'expression des différents marqueurs est plus marquée lorsque la souche a été cultivée en LB, notamment le CD40. Cependant, au-delà de l'obstacle constitué par l'utilisation de milieux de culture, aussi riches et non chimiquement définis, tels que le LB en métabolomique, le milieu de culture LB seul (sans culture des souches bactériennes), influence l'activation et la maturation des CD. Il a notamment été montré que le LB contenait des métabolites de la voie des polyamines, décrits comme possédant des propriétés immunomodulatrices^{34,231}. Aux vues de ces différentes observations, c'est le milieu de culture SCFM qui constitue le milieu de culture le plus pertinent qui a été sélectionné pour nos analyses.

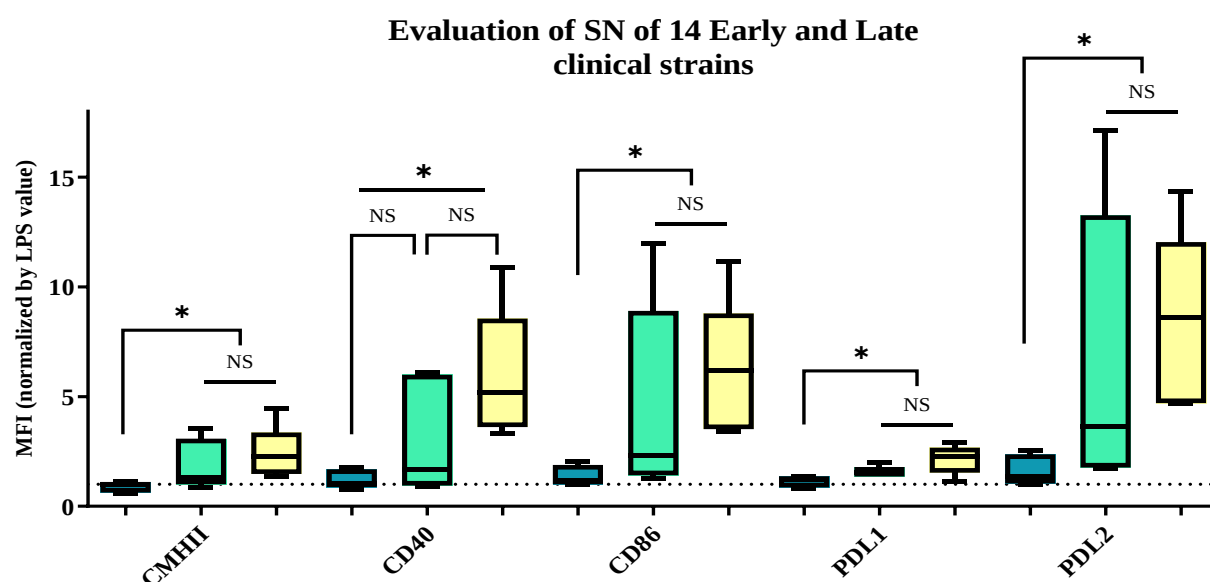


Figure 28 - Etude de l'impact du milieu de culture sur l'activation et la maturation de la CD induite par les molécules excrétées dans les SN de culture par les souches, grâce au test immunologique in vitro. Pour cette analyse préliminaire, l'évaluation a été effectuée à partir des SN des souches Précoces (Early) et Tardives (Late) issues du patient 14. Le milieu représenté en bleu correspond au milieu de culture M9, en vert au SCFM et en jaune au milieu LB. L'évaluation de l'activation et de la maturation de la CD est effectuée par CMF selon l'expression du CMHII et des molécules de co-activation (CD40/CD86) / co-inhibition (PD-L1 et PD-L2) respectivement. * : p-value < 0.05, NS : non significatif.

3.1.3. Evaluation des milieux permettant une caractérisation de l'exométabolome des souches par métabolomique.

Le choix du milieu de culture doit également permettre une caractérisation métabolomique, puisque si les métabolites excrétés dans les SN peuvent moduler l'immunité, nous devons être capable de les détecter et les identifier. Le milieu de référence pour ce type d'analyse est le milieu

M9 dit également milieu « minimum » puisqu'il est suffisamment « pauvre » pour permettre une bonne évaluation de l'exométabolome des bactéries, correspondant à l'ensemble des métabolites excrétés. Si ce milieu est idéal pour les analyses par métabolomique, il ne permet pas d'évaluer la production des immunométabolites, comme nous avons pu l'observer dans la partie précédente, probablement car il diminue la production de métabolites secondaires. De plus, ce milieu ne correspond pas à l'environnement naturel de la bactérie ce qui peut entraîner une perturbation de son métabolisme habituel. Nous avons alors cherché à valider l'utilisation du milieu SCFM pour les analyses de métabolomique par rapport au milieu M9 qui constitue actuellement le milieu de référence pour les études bactériologiques. Nous avons cherché à valider 2 points différents :

- Le milieu SCFM nous permet de différencier les souches prélevées chez différents patients.
- Nous pouvons voir des différences entre les isolats précoces et tardifs partageant pourtant de nombreuses caractéristiques.

- 3.1.3.1. Matériel et Méthode :

Une expérience préliminaire a été conduite sur les SN des souches Précoces et Tardives de 3 patients cultivées en milieu SCFM et M9 et collectées également à différentes DO correspondant au début de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Ces SN ont ensuite été déprotéinisés pour pouvoir être analysés par métabolomique : méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse non ciblée (LC-MS/MS) présentée plus précisément au cours du chapitre III. Les SN déprotéinisés ont été reconstitués dans un mélange H₂O 0,1% acide formique (FA) et 1% acétonitrile (ACN). Les différents constituants présents dans le SN ont ensuite été séparés par chromatographie liquide sur une colonne C18 (Luna Omega 1,6µm Polar C18, 150*2,1mm de Phenomenex®) puis analysés par spectrométrie de masse en tandem sur un automate qui est le QExactive munie de la technologie Orbitrap de ThermoFisher. Chaque échantillon a été analysé en triplicat. Les données obtenues ont été analysées sur le logiciel Mzmine pour les étapes de pré-processing et les analyses statistiques ont été effectuées sur MetaboAnalyst.

- 3.1.3.2. Comparaison des souches inter-patients

Une première analyse a été effectuée sur les données obtenues à partir des SN des souches cultivées en milieu de culture M9. Une très bonne différenciation des souches des 3 patients a pu être observée par une analyse non supervisée de type ACP puisque le score de séparation des patients sur la composante 1 est de 31% (Figure 28A). En effet, à partir d'un score de 20% sur une composante, nous pouvons considérer que cette séparation est significative. Pour voir la répartition des souches des patients, nous avons généré un dendrogramme par CAH (Figure 28B). Ainsi nous

pouvons voir qu'en milieu M9, les souches Précocité et Tardive du patient 1 produisent les mêmes métabolites et ceci quel que soit la phase de croissance. Il est intéressant de noter que ces souches ont conservé l'utilisation de voies métaboliques communes et la production des mêmes métabolites au cours du temps, s'adaptant de la même façon à la phase de croissance, contrairement au patient 3 pour lequel on voit des différences entre les isolats Précocité et Tardif, même s'ils appartiennent au même bras du dendrogramme. On note également que ces souches sont plus proches du milieu de culture de base que celles des autres patients.

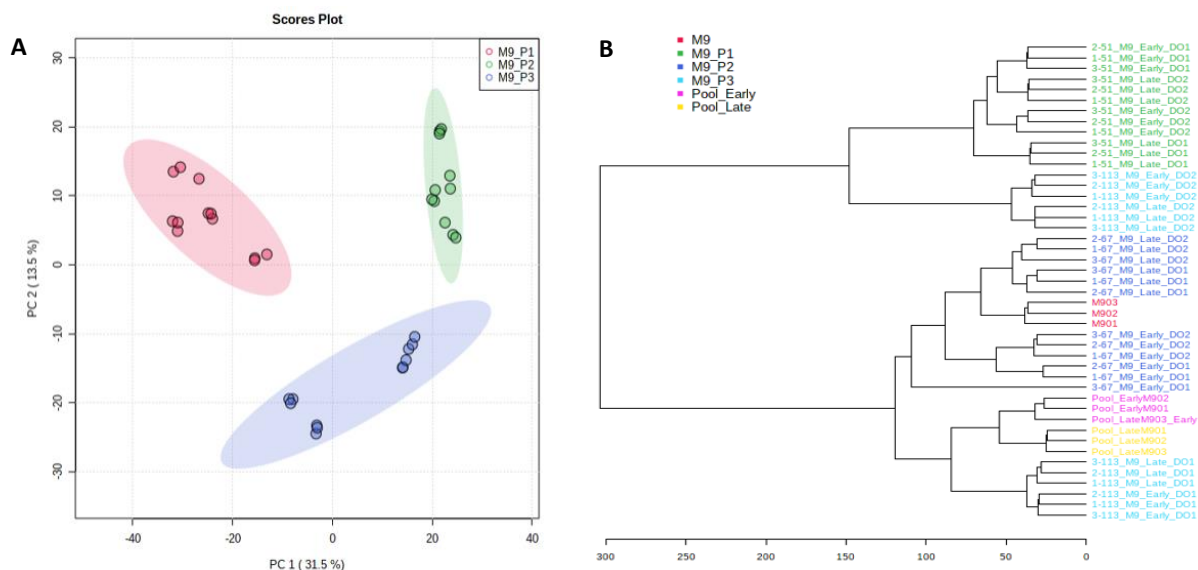


Figure 29 - Représentation de la séparation des SN des souches des 3 patients lors de la culture en milieu M9 par analyse ACP en A, et dendrogramme constitué par CAH en B. La représentation en dendrogramme permet de visualiser la répartition des souches pour chaque patient. Les 3 patients sont respectivement identifiés par P1, P2, et P3. Chaque échantillon a été analysé en triplicat d'injection. Le milieu seul, sans culture bactérienne a également été évalué ainsi que des pools des SN des souches Précoces et Tardives des différents patients (Early et Late respectivement)

De la même façon, nous arrivons à mettre en évidence des différences entre les patients en milieu SCFM et ceci toujours sur une analyse non supervisée de type ACP (score de 24,6% sur la composante 1, Figure 29A). Il est intéressant de noter que la séparation des patients est différente que celle obtenue en milieu M9. En effet, on note une proximité des patients 2 et 3 et des différences plus importantes avec le patient 1, mais également une séparation marquée du patient 1 entre les phases de croissance exponentielle et stationnaire (figure 29A). La représentation en dendrogramme, nous permet de compléter cette analyse. En effet, nous voyons sur la figure 29B que les souches Early et Late du patient 3 sont regroupées et ceci quel que soit la phase de croissance. Concernant le patient 1, nous voyons que les souches Early et Late se comportent de la même façon pour une phase de croissance donnée puisque la séparation se fait pour les différentes DO. Enfin, les souches du patient 2 sont séparées d'abord en fonction des phases de croissance puis

en fonction des isolats Précoces et Tardifs. Nous avons ainsi pu montrer que nous étions capables de différencier l'exométabolome des souches de patients distincts, lorsque celles-ci étaient cultivées dans le milieu de culture SCFM.

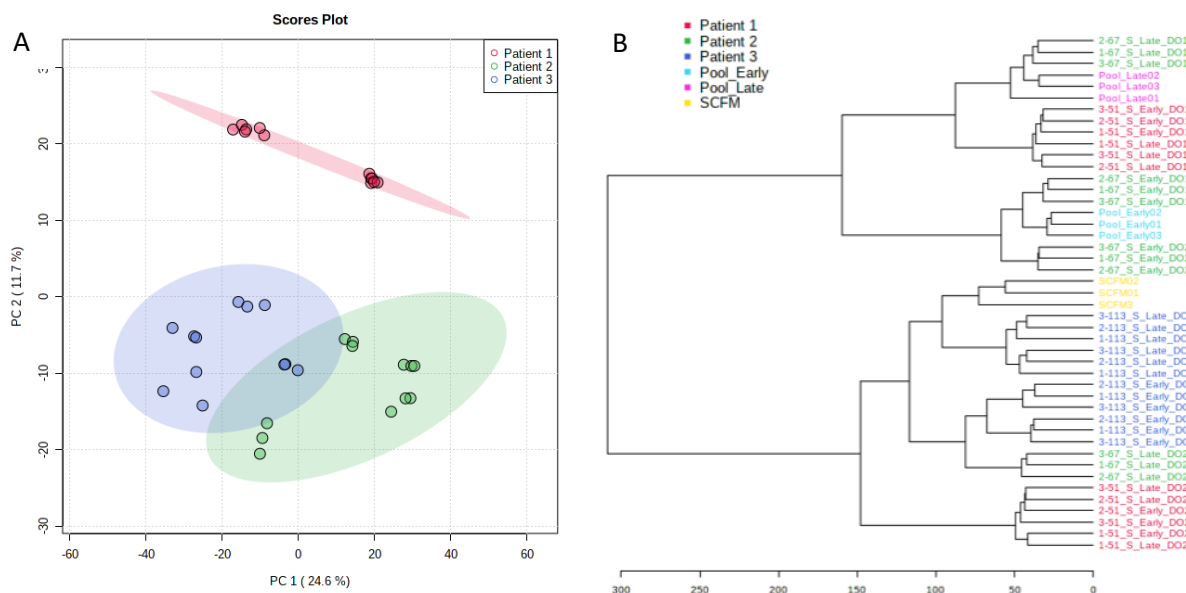


Figure 30 - Représentation de la séparation des SN des souches des patients lors de la culture en milieu SCFM (analyse ACP, A) et de la classification des souches des 3 patients (B). Les 3 patients sont respectivement identifiés par P1, P2, et P3. Chaque échantillon a été analysé en triplicat d'injection. Le milieu seul, sans culture bactérienne a également été évalué ainsi que des pools des SN des souches Précoces et Tardives des différents patients (Early et Late respectivement)

• 3.1.2.3. Comparaison intra-patient – souches Précoces vs Tardives

Une deuxième analyse a été effectuée pour comparer les isolats Précoces et Tardifs de chaque patient. Cette comparaison est effectuée sur le paramètre où il est le plus difficile de les distinguer puisqu'il s'agit de deux isolats de la même bactérie, du même clone ayant évolué dans les voies respiratoires des patients. Nous avons néanmoins pu observer des différences entre les exométabolomes des souches, collectés après culture en milieu SCFM et M9 (Figure 30). En effet les pools des SN de culture des isolats Précoces et Tardifs des souches des différents patients sont séparés aussi bien après culture en milieu M9 que SCFM, sur une analyse non supervisée de type ACP. Cette différence est mise en évidence par les pourcentages importants de séparation observés sur la composante 1 et la composante 2, de 34% et 16% respectivement. Nous avons donc pu observer des différences entre les isolats Précoces et Tardifs issus d'un même patient, en plus des différences observées entre les exométabolomes des isolats collectés chez différents patients et à différents moments de la courbe de croissance. Ces résultats valident la faisabilité de l'analyse par métabolomique des SN lorsque les souches sont cultivées en milieu de culture SCFM.

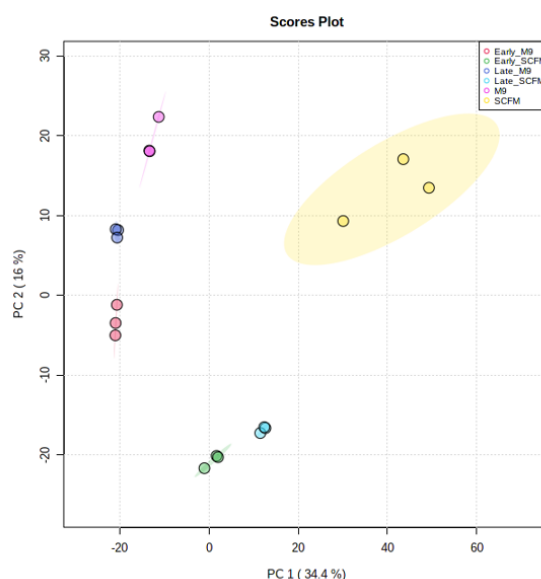


Figure 31 - Représentation des pools des SN des souches Précoces (Early) et Tardives (Late) cultivées en milieu M9 et SCFM, ainsi que les milieux seuls sans croissance bactérienne (analyse non supervisée de type ACP). Les échantillons ont été évalués en triplicat.

➤ 3.2. Impact de la phase de croissance sur l'évaluation de l'exométabolome

Le métabolisme de la souche, ainsi que la consommation et la production de métabolites sont très dépendants de la phase de croissance²³². Cela a notamment été mis en évidence sur des voies métaboliques comme celle de l'Anthranilate²³³. Ce métabolite est un des métabolites finaux de la métabolisation du Tryptophane mais c'est également le précurseur utilisé pour la synthèse de molécules telles que celles du quorum sensing, dont l'expression va augmenter avec la concentration bactérienne, mais également pour la synthèse des sidérophores²²⁴. Choi Y. et al. ont ainsi montré que la régulation de cette voie évoluait en fonction de la phase de croissance, en comparant la phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire tardive²³³. Une autre étude a également mis en évidence une différence de l'expression de 200 gènes en fonction de la phase de croissance évaluée²²⁹. Dans cette partie, nous avons cherché à identifier le point de la courbe de croissance le plus adapté pour l'identification de métabolites immunomodulateurs.

▪ 3.2.1. Matériel et Méthode

Différents points de la courbe de croissance ont été évalués par le test immunologique *in vitro*, présenté dans le chapitre I partie 3.1.2 et plus particulièrement au cours du chapitre II, afin de trouver les conditions optimales pour analyser les propriétés immunomodulatrices des métabolites excrétés par les souches de Pa. Pour cette évaluation, les isolats Précoces et Tardifs collectés chez 4 patients différents, et qui présentaient des courbes de croissance similaires ont été évalués. Leur croissance en milieu de culture SCFM a été suivie par la DO et les SN ont été collectés à différents points de la courbe de croissance : le début de phase exponentielle, le milieu de la phase

exponentielle et début de phase stationnaire. La phase de croissance stationnaire tardive n'a pas été évaluée afin d'éviter que la mortalité bactérienne n'induisse le relargage de métabolites intracellulaire dans le milieu. Les SN ont été collectés et déprotéinisés avant que leur impact sur l'activation et la maturation des CD sous activation LPS, ne soit évaluée en fonction de l'expression du CMHII et des molécules de co-activation et co-inhibition en CMF. La médiane d'intensité de fluorescence (MFI) de chaque marqueur membranaire est obtenue à l'aide du logiciel FlowJo (V10) puis cette valeur est normalisée par l'expression du même marqueur obtenue dans la condition LPS seul.

▪ 3.2.2. Résultats

Les SN de culture collectés en début de phase exponentielle n'entraînent pas de modification de l'expression des marqueurs membranaires par rapport à la condition LPS, quel que soit la souche étudiée. Des variations d'expression ont pu être observées uniquement à partir de la phase exponentielle de croissance. Ces variations entraînent :

- Une augmentation de l'expression des marqueurs membranaires en phase exponentielle mais une diminution en phase stationnaire.
- Ou une augmentation de l'expression de plus en plus marquée jusqu'en phase de croissance stationnaire.
- Ou une diminution de l'expression des marqueurs membranaires quel que soit la phase de croissance

Ces résultats sont représentés pour 4 des souches, concernant le CMHII (figure 32 A) et un des marqueurs de co-activation le CD40 (figure 32 B). Les 4 souches entraînaient une augmentation de l'expression du CMHII par rapport à la condition LPS seul, mais celle-ci pouvait être amplifiée par les SN collectés au cours de la phase stationnaire par rapport à ceux collectés en phase exponentielle, comme cela est observé avec les souches 14.1 et 26.3, ou au contraire diminuée, comme observé cette fois avec les souches 107.1 et 125.1. Concernant le CD40, une diminution de son expression par rapport à la condition LPS seul a pu être observée à partir de la phase de croissance exponentielle ou stationnaire, avec les SN des souches 107.1 et 125.1 respectivement. Une augmentation graduelle de l'expression du CD40 a pu être montrée avec la souche 14.1 alors que le SN de la souche 26.1 entraînait une diminution de celle-ci à partir de la phase stationnaire. Ainsi, la phase de croissance exponentielle précoce n'a pas été conservée. Nous n'avons cependant pas pu trancher sur la phase de croissance la plus pertinente, entre les phases exponentielles et stationnaires, pour l'évaluation des immunométabolites produits par les souches. Nous avons donc choisi d'analyser les SN collectés au cours de ces deux phases afin d'avoir une vue d'ensemble des immunométabolites produits par Pa.

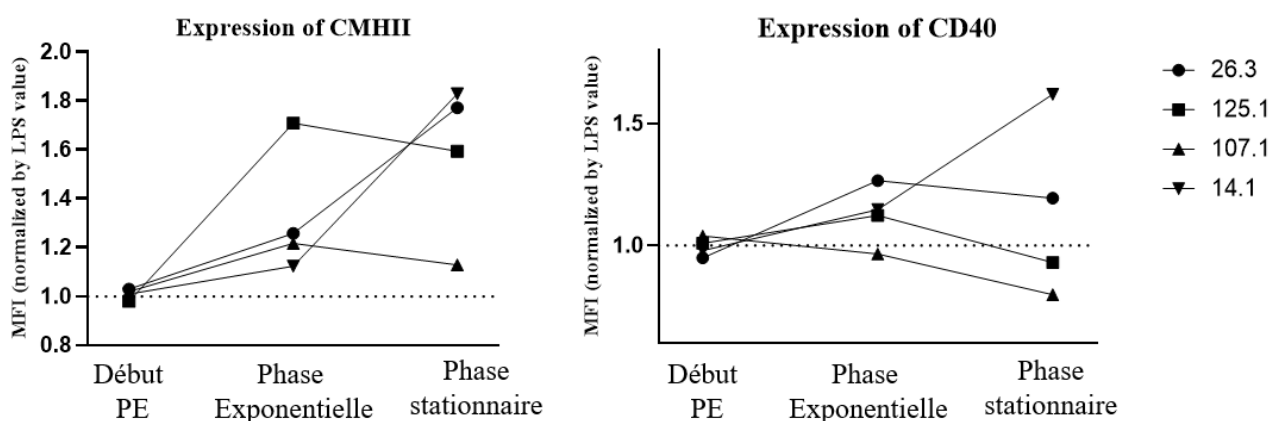


Figure 32 – L'expression de la MFI (médiane de fluorescence) du CMHII et du CD40 induite par le LPS n'est pas modulée par les SN de culture collectés au début de la phase de croissance exponentielle mais par ceux collectés à partir du milieu (mid-log) de la phase exponentielle. Les modulations observées varient entre la phase de croissance exponentielle et stationnaire mais différemment entre les souches. (PE : Phase exponentielle).

En conclusion des différentes mises au point détaillées auparavant, le **milieu de culture SCFM** permet d'obtenir le meilleur compromis entre un milieu suffisamment riche pour permettre la production de métabolites possédant des propriétés immunomodulatrices évaluable *in vitro* par un test immunologique, mais suffisamment « pauvre » et présentant l'avantage d'être un milieu chimiquement défini pour permettre l'analyse de l'exométabolome des souches par métabolomique en LC-MS/MS. Ce milieu permet également d'être au plus près de l'environnement de croissance habituel de la souche et ainsi de diminuer l'adaptation métabolique de ce bacille versatile. Des métabolites immunomodulateurs sont produits à partir de la **phase exponentielle de croissance**, et ils peuvent être modifiés au cours de la **phase stationnaire précoce**, les deux phases semblent donc être intéressantes pour effectuer cette caractérisation.

4. Méthodologie optimisée de la culture des souches.

L'ensemble des étapes de la culture prenant en compte les mises au point, sont détaillées sur la figure 33. Les souches de la banque ont été cultivées en milieu SCFM. Une pré-culture a été réalisée dans 1ml de milieu pendant une durée allant de 12h à 24h à 37°C. Deux cultures sont ensuite lancées en parallèle dans 2,5ml de milieu de culture à DO 0,1 puis stoppées en phase exponentielle et en phase stationnaire pour chaque bactérie de la banque. Le temps de culture est variable entre les souches pouvant aller de 4 à 18h. Une dilution en cascade est ensuite effectuée et ces différents points sont étalés sur géloses LB-agar pour réaliser le comptage des Unité Formant Colonie (CFU) après une incubation à 37°C pendant 24 à 48h. Le reste de la culture est filtré à 0,22 µm afin d'éliminer l'ensemble des bactéries et ne collecter que le surnageants de culture. Enfin, les aliquots sont passés dans l'azote liquide pour stopper immédiatement le métabolisme et la dégradation des composés contenus dans le SN.

Une étape pré-analytique de déprotéinisation des SN est nécessaire avant l'évaluation de l'échantillon que ce soit par le test immunologique *in vitro* ou par métabolomique. En effet l'élimination des protéines est nécessaire pour l'acquisition en spectrométrie de masse afin d'obtenir une large gamme de métabolites. Cela permet également d'éliminer des protéines qui pourraient jouer le rôle de TLR ligand dans le test immunologique *in vitro*, telles que la flagelline^{234,235}. Les protéines sont précipitées par ajout de méthanol froid dans un rapport de 1 volume de SN pour 4 volumes de méthanol. Le mélange est vortexé puis incubé 30 min à 4°C, avant d'être centrifugé pour éliminer les protéines précipitées. Le SN récolté est enfin placé sous évaporateur à azote pour obtenir un extrait sec. Pour chaque échantillon, 5 aliquots ont été générés afin de pouvoir analyser leurs propriétés immunomodulatrices sur CD, les caractériser par une approche LC-MS/MS et enfin valider leurs propriétés sur des co-cultures DC-LT.

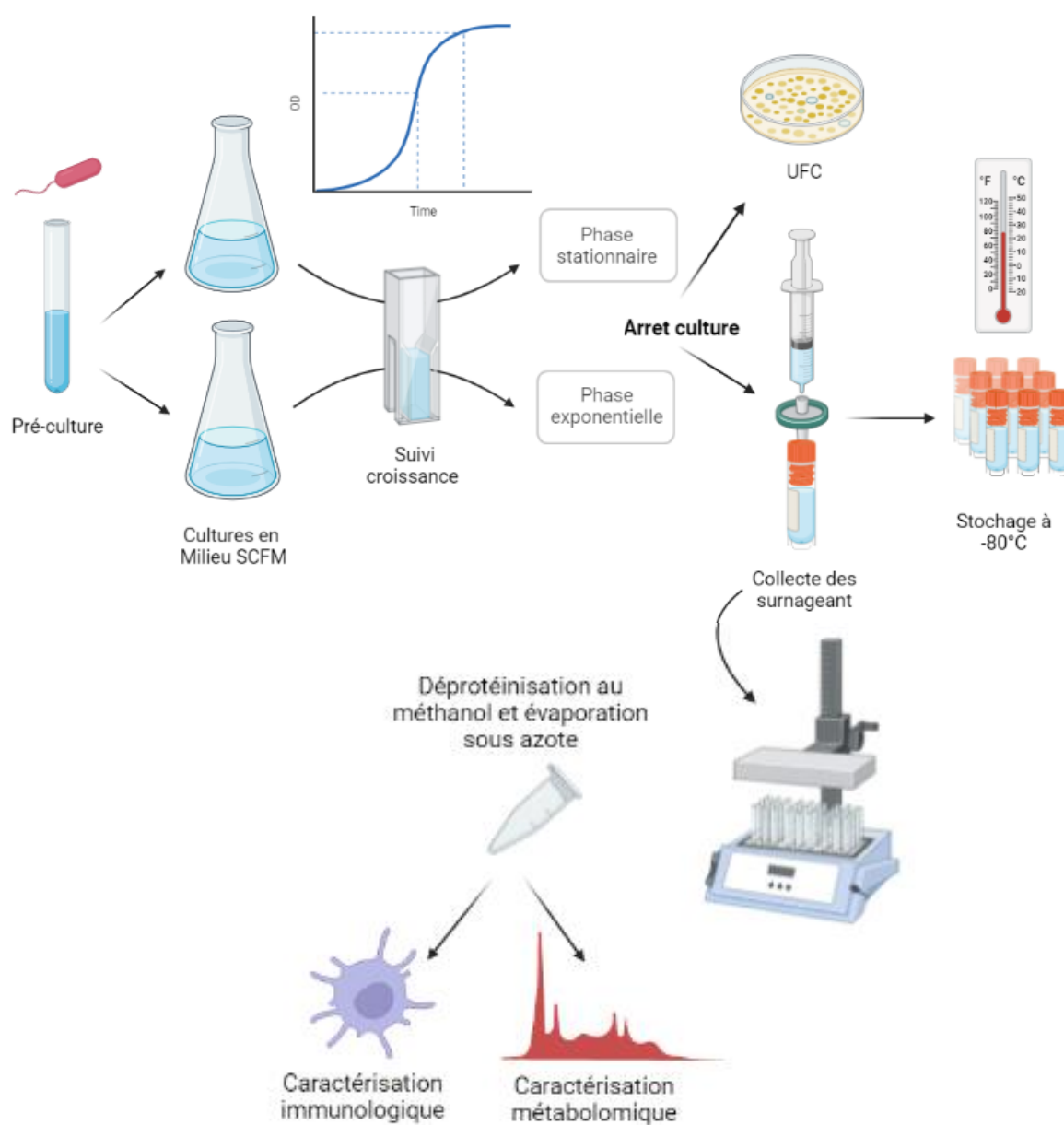
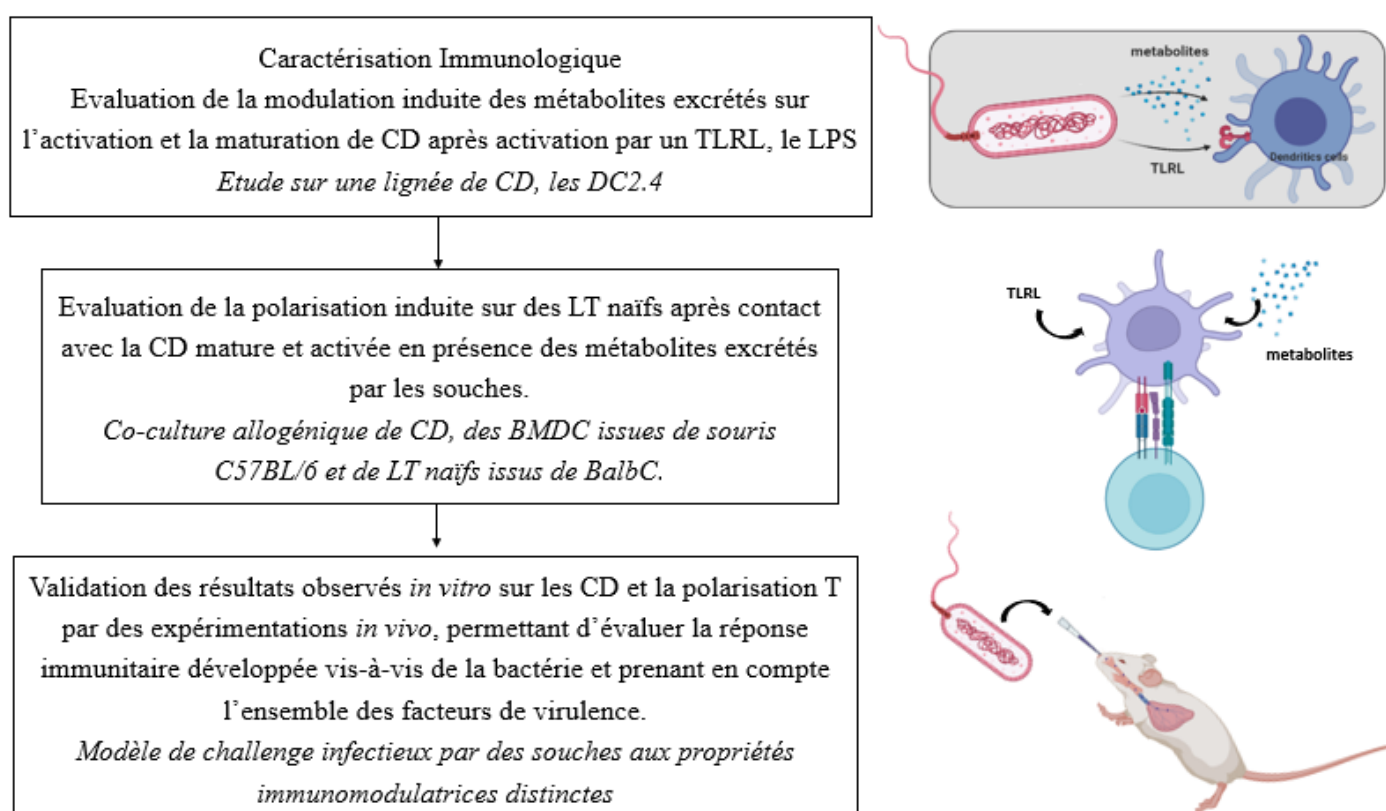


Figure 33 - Présentation des étapes nécessaires à la culture des isolats de la banque. Les souches sont cultivées en milieu liquide SCFM puis la culture est stoppée en phase exponentielle et en phase stationnaire. La croissance bactérienne est suivie par l'évolution de la DO. Une partie de la culture est utilisée pour pouvoir effectuer un dénombrement des UFC, l'autre partie est filtrée pour pouvoir collecter le SN. Enfin une étape de déprotéinisation au méthanol est effectuée pour obtenir les extraits secs. Ces échantillons font l'objet d'une caractérisation immunologique (présentée dans le chapitre II) et métabolomique (présentée dans le chapitre III) (schéma généré avec BioRender).

Chapitre II : Etude des capacités immunomodulatrices des souches de *Pseudomonas aeruginosa* médiée par les métabolites.

L'interaction entre l'hôte et le pathogène met en jeu le système immunitaire. L'hôte va mettre en place des mécanismes immunologiques pour lutter contre l'infection. En parallèle, la bactérie va développer différents mécanismes d'échappement vis-à-vis du système immunitaire. Si au cours des premières phases de l'infection la bactérie va notamment lutter contre l'immunité du patient en induisant une destruction des cellules immunitaires par l'injection de toxines à l'aide du SST3 entraînant des réponses plutôt pro-inflammatoires, le passage à la chronicité est représenté majoritairement par une diminution de l'ensemble des caractéristiques qui pourrait stimuler et permettre sa reconnaissance par le système immunitaire. Un autre des mécanismes mis en place par la bactérie peut être basé sur la modulation du système immunitaire afin d'induire une immunosuppression, mécanisme qui pourrait être médié par l'excrétion de métabolites immunomodulateurs. Dans ce chapitre, nous présenterons la caractérisation immunologique de l'exométabolome que nous avons réalisée tout d'abord *in vitro* puis *in vivo*, selon le workflow présenté ci-dessous :

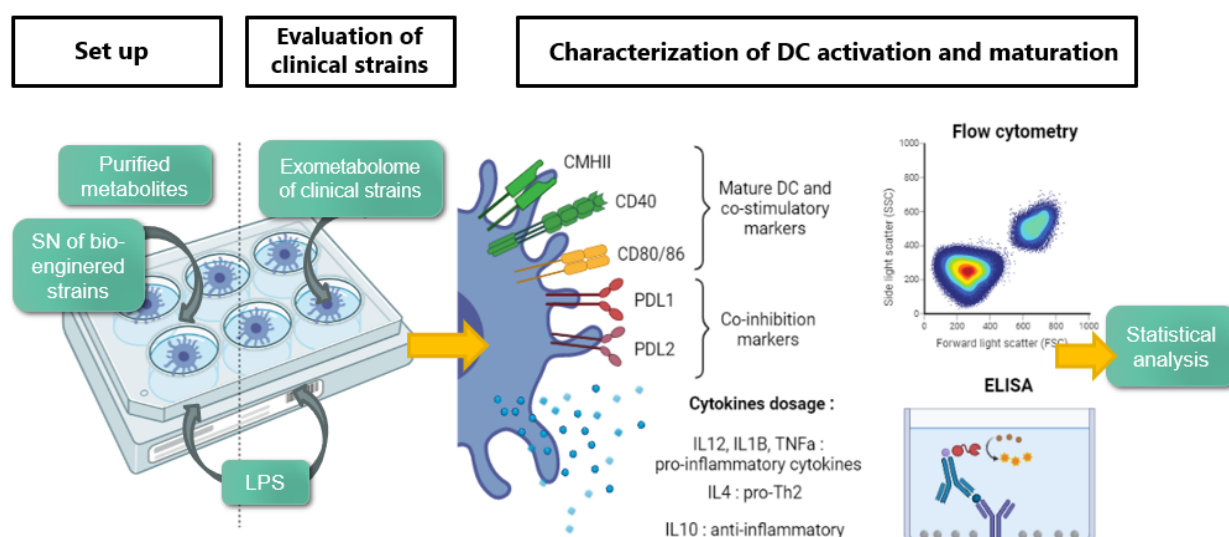


I. Etude de la modulation de l'activation et la maturation de la CD par l'exométabolome des souches

1. Présentation générale du test immunologique *in vitro* et des mises au point.

Un test immunologique *in vitro* a été développé afin de mettre en évidence puis de caractériser les capacités immunomodulatrices des souches cliniques de Pa. Par la suite, il permettra également la validation des propriétés immunomodulatrices de métabolites d'intérêts identifiés par approche de métabolomique.

Ce test consiste à activer des CD à l'aide d'un TLRL puis à analyser par CMF la modulation de l'activation et la maturation de la CD en présence des surnageants de culture ou de métabolites purifiés par évaluation de l'expression du CMHII ainsi que de marqueurs de co-activation (CD40 et CD86) et de co-inhibition (PDL1 et PDL2). La fonction de la CD peut également être évaluée par la production des cytokines suivantes : IL12, IL1 β , TNF α , IL4 et IL10, dosées par Luminex (Figure 34).



➤ 1.1. Cellules d'étude : les DC2.4

Le test immunologique *in vitro* est basé sur l'utilisation d'une lignée de cellules dendritiques, les DC2.4. Cette lignée est issue de CD murines isolées à partir d'une moelle osseuse de souris C57BL/6 et immortalisées à l'aide de vecteurs rétroviraux exprimant le GM-CSF et les oncogènes raf et myc. L'utilisation d'une lignée cellulaire permet d'obtenir une grande quantité de

cellules homogènes et ainsi de s'affranchir des variabilités interindividuelles lors de la génération de BMDC permettant l'obtention de résultats plus reproductibles. Cette approche est particulièrement adaptée pour le criblage de différentes molécules, et dans notre étude pour l'évaluation de SN complexes. Ces cellules présentent les mêmes caractéristiques phénotypiques et une expression de marqueurs de surface similaire à une CD primaire (figure 35). Enfin elles possèdent toujours leur capacité de phagocytose afin de présenter des antigènes par l'intermédiaire du CMH de classe I et II (fiche technique DC2.4, Merck). Ces cellules présentent une forte expression du CMHI et des molécules de co-stimulation CD86, CD16/CD32 et CD54, une expression intermédiaire du CD80 et du CMHII et une faible expression du DEC-205, un marqueur des CD. Pour s'assurer que les cellules n'étaient pas infectées par des mycoplasmes, une analyse a été réalisée à l'aide du kit MycoAlert™ de Lonza.

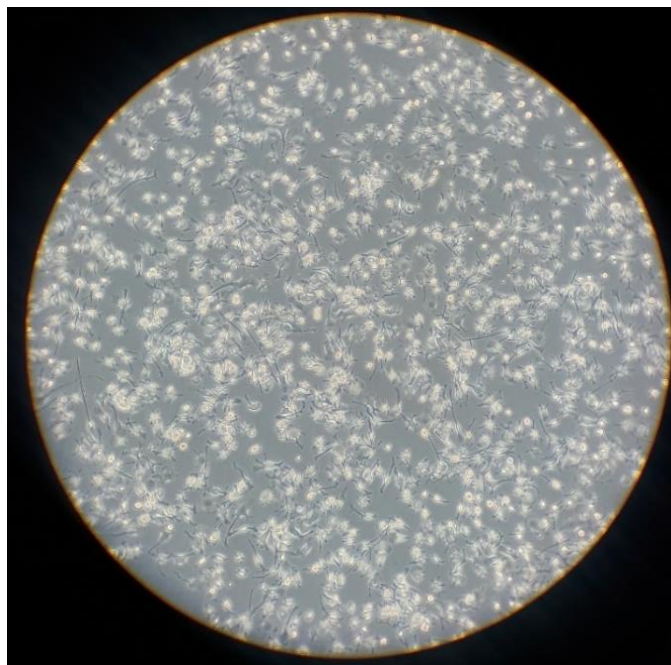


Figure 35 – Lignée de CD, les DC2.4 en culture

➤ 1.2. Mise au point du test immunologique *in vitro* pour l'évaluation de SN complexes ou de métabolites purifiés

Différentes mises au point ont été réalisées sur la culture des CD, notamment sur le choix du TLRL, du milieu et du temps de culture pour obtenir un test sensible pour l'évaluation des exométabolomes des souches. Le test devait également permettre d'être au plus près des conditions d'activation naturelles des CD. En effet, le milieu de culture par exemple joue un rôle majeur dans la maturation et la fonction de la CD, notamment car il impacte son statut métabolique²³⁶.

■ 1.2.1. Matériel et Méthode

Nous avons également évalué 3 TLRL différents, un TLR3L : le poly IC, un TLR4L : le LPS et un TLR9L : les CpG ODN 1826, et ajusté leurs concentrations pour obtenir une activation marquée tout en limitant la mortalité qu'elle induit sur les CD. Par la suite, seuls les résultats obtenus sur le LPS seront présentés, à l'exception du choix du milieu de culture réalisé sous stimulation par le Poly IC. Le LPS a été sélectionné pour être au plus près des conditions naturelles d'activation des CD, en présence de bactéries.

Les conditions de culture ont été ajustées afin d'évaluer la maturation des CD. Nous avons comparé l'expression des marqueurs membranaires des CD après stimulation par un TLRL, le Poly IC, après culture dans deux milieux différents : le milieu de culture RPMI supplémenté en Sérum de Veau Fœtal (SVF) et un milieu sans sérum, le milieu AIMV. Les milieux sans sérum sont souvent utilisés afin d'éviter la présence d'éléments d'origine animale et de contaminants. Ils permettent également une analyse plus fine de certains constituants cellulaires comme les protéines et de diminuer la variabilité des résultats entre les expérimentations.

La stimulation médiée par les TLRL entraîne une certaine mortalité des CD. Il a donc été nécessaire d'évaluer le temps de culture optimal pour permettre une forte activation et maturation de la CD sans que la mortalité puisse impacter les résultats. La mortalité des cellules a été analysée par CMF grâce à un marqueur de viabilité, le LiveDead de ThermoFisher.

■ 1.2.2. Sélection du milieu et du temps optimal de culture

Les milieux de culture RPMI et AIMV ont été comparés afin de choisir le milieu de culture le plus adapté à l'évaluation de l'activation et de la maturation de la CD. La stimulation par le Poly IC entraîne une augmentation de l'expression de marqueurs de co-activation tels que le CD40 ou le CD80. Cependant, nous pouvons observer sur la figure 36A, que l'augmentation de l'expression du CD40 est beaucoup plus marquée en milieu de culture AIMV qu'en milieu RPMI : 18,6% et 1,46% respectivement. La stimulation des CD entraîne également une augmentation de l'expression du PD-L1 qui exerce un rétrocontrôle et empêche un emballement trop important de la réponse immunitaire T. L'augmentation de l'expression du PD-L1 est également plus limitée en milieu de culture RPMI qu'en milieu AIMV, représenté sur l'histogramme où la fluorescence des cellules est plus importante en AIMV, se traduisant par un décalage de la courbe vers la droite (figure 36 B). Ces résultats mettent en évidence une activation et une maturation beaucoup plus marquées lorsque celles-ci sont cultivées en milieu sans sérum AIMV, c'est ce milieu qui a été sélectionné pour la suite des analyses.

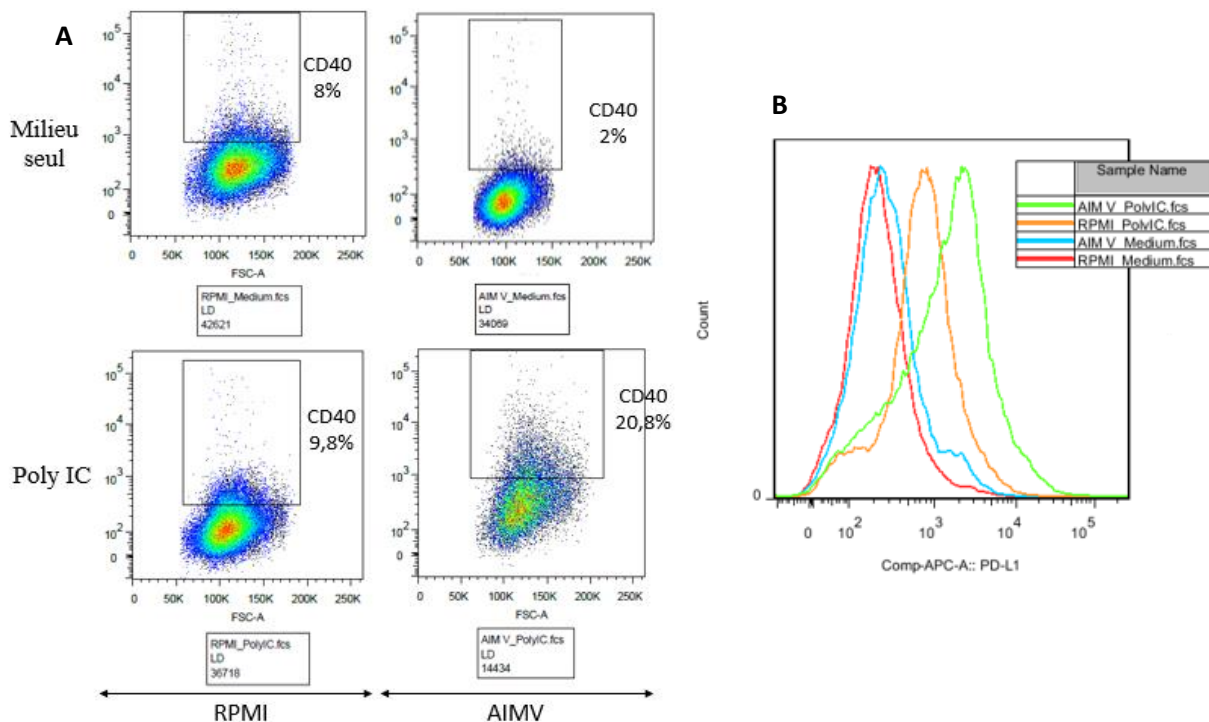


Figure 36 – Comparaison de l'activation et de la maturation de la CD en milieu de culture RPMI et AIMV. Représentation des résultats obtenus par CMF sur l'expression du CD40 à l'état basale et en présence du PolyIC, dans les milieux de culture : RPMI et AIMV (A) et histogramme représentant l'expression du PD-L1 à l'état basal, en milieu de culture RPMI (courbe rouge) et AIMV (courbe bleu) puis après stimulation par le PolyIC, courbe verte et orange respectivement (B). L'expression des marqueurs membranaires, que ce soit le CD40 ou le PD-L1 est plus marquée dans le milieu AIMV permettant une analyse plus fine des CD en CMF.

Une importante mortalité des CD est induite après stimulation par le TLRL. Celle-ci augmente avec le temps de culture, passant de 72% de cellules vivantes à 24h à 28.8% à 48h. A l'inverse, l'expression des marqueurs membranaires que nous cherchons à évaluer tels que le CMHII, le CD80 et le PD-L1 augmente avec le temps de culture (Figure 37). Afin de pouvoir observer au mieux l'expression des marqueurs membranaires tout en préservant le nombre de cellules viables, nous avons choisi un temps de culture de 36h.

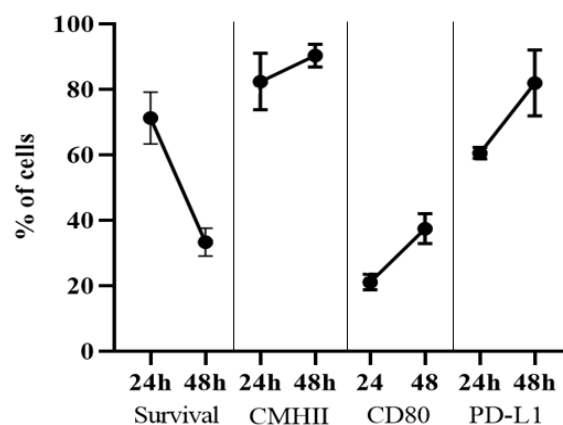


Figure 37 – Etude de l'évolution de la survie cellulaire des DC2.4 ainsi que de l'expression des marqueurs membranaires en fonction du temps de culture. Les résultats sont représentés par le pourcentage de cellules vivantes puis selon le pourcentage de cellules exprimant chaque marqueur membranaire à 24 et 48h.

➤ 1.3. Présentation des aspects techniques du test immunologique *in vitro*

Pour réaliser ce test, les DC2.4 sont cultivées en milieu de culture RPMI (RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement, ThermoFisher Scientific) en flasque (Falcon™), pour un maximum de 10 passages. Les cellules sont ensuite collectées et resuspendues en milieu de culture AIMV™ (ThermoFisher Scientific) à une concentration de 1million de cellule/ml. Les cellules sont alors mises en culture en plaque 6 puits pendant 36h à 2 millions de cellules par puits (Figure 38). Les CD sont ensuite activées par ajout de LPS (1µg/ml) (Sigma). Cette concentration de LPS a été sélectionnée car elle permet d'obtenir une activation et une maturation marquée de la CD tout en limitant la mortalité cellulaire. Différents éléments peuvent ensuite être ajoutés et ainsi analysés grâce à ce test immunologique :

- Pour l'analyse de la modulation de l'activation et de la maturation des CD par les métabolites excrétés par les isolats, ou exométabolome, nous avons utilisé des SN préalablement déprotéinisés et conservés sous forme d'extrait sec avant d'être reconstitués par ajout de 50µl de milieu de culture AIMV™. Pour chaque test, 50µl de SN déprotéinisés sont ajoutés pour 1million de CD.
- Pour l'analyse de la modulation induite par les métabolites identifiés, différentes concentrations du métabolite sont ajoutées au milieu de culture. Une première analyse est effectuée après stimulation par du LPS puis celle-ci devra être complétée en présence d'autres TLR ligands puisque des modulations différentes peuvent être observées en fonction du TLR stimulé, comme présenté en introduction²².

Pour évaluer la **fonction des CD**, les surnageants de culture des puits ont été collectés après 36h d'incubation et stockés à -80°C afin de **doser les cytokines** relarguées par test ELISA. Les CD sont ensuite récoltées afin d'évaluer **leur maturation et leur activation** par l'expression de marqueurs membranaires analysés par CMF. Pour cela, les cellules sont collectées dans des tubes FACS. Une centrifugation à 400G pendant 8min est réalisée afin de culoter les cellules pour réaliser le marquage FACS. Une incubation des cellules dans 50µl de PBS contenant du Fc Block™ à une concentration de 0,5mg/ml est effectuée pendant 10 min afin de limiter la fixation non spécifique des anticorps de cytométrie aux CD par l'intermédiaire des récepteurs Fc présents à leur surface. Pour le marquage, 50µl de PBS contenant 1µg de chaque anticorps est ajouté pour une réaction dans un volume final de 100µl, nous avons analysé les marqueurs membranaires suivants : CD11c (FITC), CMHII (PerCPCy5), CD40 (PE), CD80 ou CD86 (PeCy7), PDL1 (APC), PDL2 (BV421). L'incubation est réalisée pendant 15min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un marqueur de viabilité cellulaire est également incubé avec les cellules, le Live/Dead™ Fixable Yellow de Thermo Fisher. Ce marqueur permet de marquer les cellules dont la membrane a été lésée par fixation aux groupements amines libres présents à l'intérieur de la cellule, en plus de la

fixation extracellulaire commune à toutes les cellules. Les anticorps non fixés aux marqueurs membranaires sont ensuite éliminés par lavage par 1 ml de PBS. Pour fixer les cellules, 100µl de FACS Lysing solution 1x est ajouté au tube. Le marquage des cellules est ensuite évalué par cytométrie en flux sur le FACSCanto™II ou le FACSLytic™ de BD. Les données ont été acquises par le logiciel Diva8 puis FACSSuite (V10) puis retraitées par le logiciel Flow Jo v10.8.1. Les analyses des données de cytométrie ont été effectuées de la façon suivante : la population de CD est sélectionnée sur la fenêtre FSC/SSC représentant la taille et la granularité des populations de cellules, respectivement. Nous sélectionnons ensuite les singulets, ceci pour sélectionner uniquement les cellules qui sont passées une par une devant le laser. En effet, si deux cellules passent en même temps, la fluorescence est augmentée de façon artificielle. Enfin, ce sont les cellules vivantes qui sont sélectionnées, les cellules mortes étant plus fluorescente car marquées au LiveDead™ en V500. Pour cette partie de l'analyse nous travaillons sur une lignée, il n'est donc pas nécessaire de resélectionner une population, nous pouvons directement analyser l'expression des différents marqueurs à savoir, le CD11c, le CMHII, le CD40, le CD86, le PD-L1 et le PD-L2.

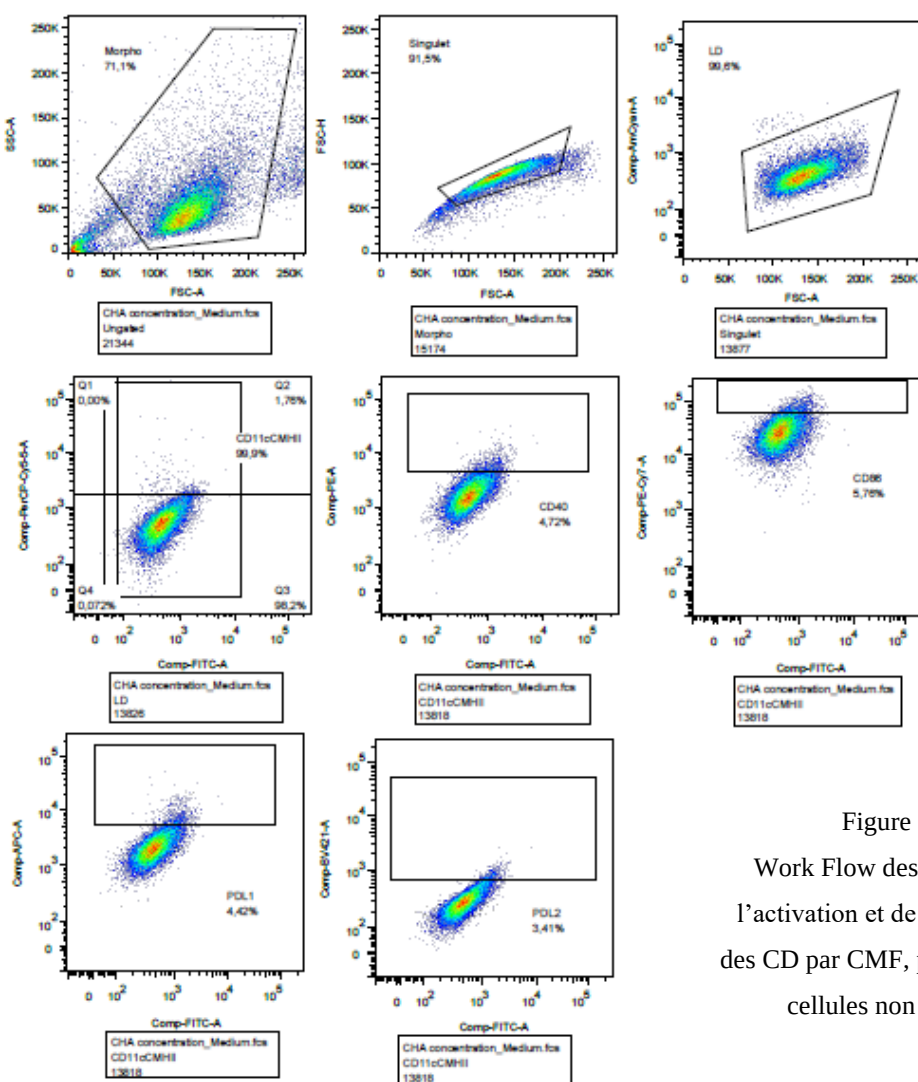


Figure 38 :
Work Flow des analyses de
l'activation et de la maturation
des CD par CMF, présenté sur les
cellules non activées.

Pour le dosage des cytokines, nous avons utilisé le MAGPIX® (bio-rad) afin de pouvoir multiplexer les cytokines à doser. Nous avons évalué les cytokines suivantes : IL-12, IL-1 β , IL-4, TNF α , IL-10 grâce au kit Mouse Luminex Discovery Assay de R&D System. Le dosage est réalisé comme un ELISA classique, cependant les anticorps sont couplés à des billes magnétiques, permettant l'analyse d'un grand nombre de cytokines de façon simultanée. Les DC2.4 produisent assez peu de cytokines sous activation LPS, les résultats ne seront donc pas présentés, c'est une des limites de ce modèle.

➤ 1.4. Validation du test sur métabolites purifiés

Une fois ces différentes étapes de mises au point réalisées, nous avons évalué la capacité de notre test à mettre en évidence les immunomodulations induites par des métabolites immunomodulateurs déjà bien caractérisés quant à leurs propriétés immunomodulatrices.

▪ 1.4.1 Matériel et Méthode

Nous avons ainsi évalué deux métabolites : la Kynurénine, connue pour ses propriétés immunosuppressives et l'Arginine, préalablement décrit pour ses propriétés immunostimulantes. Pour ces analyses, les CD ont été activées par du LPS (1 μ g/ml) puis la Kynurénine a été ajoutée à différentes concentrations. La concentration minimale permettant d'obtenir un effet était de 168 μ M, c'est donc celle-ci qui a été utilisée pour la suite des tests. Nous avons également observé l'effet de l'Arginine, décrite pour ces propriétés immunostimulantes, sur l'activation et sur l'expression des marqueurs de co-activation et de co-inhibition de la CD sous activation LPS. De la même façon, différentes concentrations ont été évaluées et nous avons choisi celle à 0,5 μ g/ml.

▪ 1.4.2. Modulation de l'activation et la maturation des CD par les métabolites

En présence de Kynurénine, nous avons pu observer que le métabolite seul n'induisait pas d'effet sur l'expression des marqueurs membranaires par rapport à l'état basal de la cellule, à l'exception d'une augmentation du PDL2 (Figure 40). Après stimulation des CD par le LPS, la Kynurénine a induit une diminution de l'expression du CMHII et du CD40 parallèlement à une augmentation des marqueurs de co-inhibition, le PD-L1 et le PD-L2 (Figure 39 et 40). Ces résultats valident les propriétés déjà décrites de la Kynurénine comme immunosuppressive. Ceci est mis en évidence après activation des CD par LPS mais des résultats similaires sont observés lorsque les CD sont activées par le Poly IC ou les CpG.

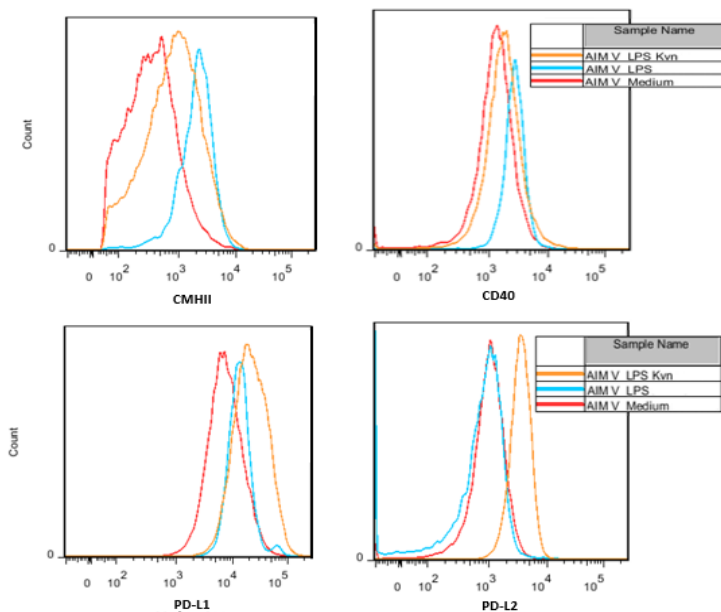


Figure 39 – Représentation en histogramme de l'expression de différents marqueurs membranaires à l'état basale (courbe rouge) puis sous activation LPS (courbe bleu) et en présence de LPS et de Kynurénine purifiée (courbe jaune). Une diminution de l'expression du CMHII et de CD40 est observée en présence de Kynurénine, par rapport à la condition LPS seul, tandis qu'une l'expression du PD-L1 et du PD-L2 est augmentée.

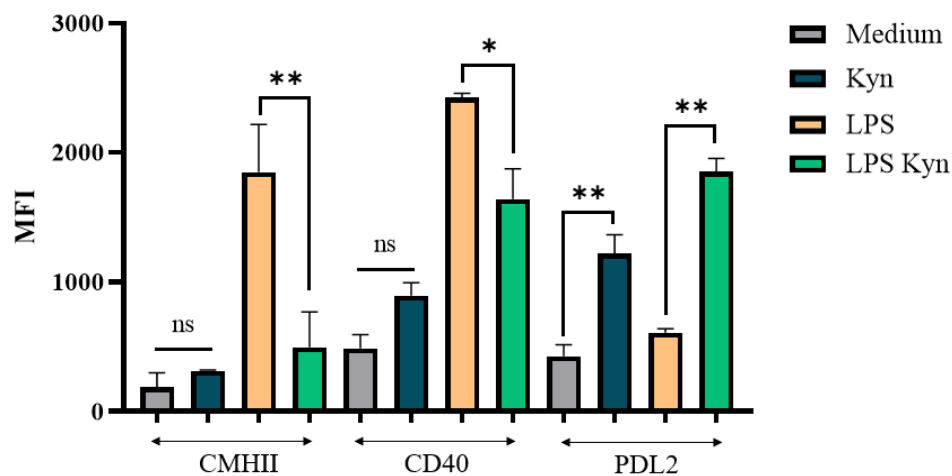


Figure 40 - Evaluation de l'effet de la Kynurénine sur l'expression des différents marqueurs membranaires. La Kynurénine seule n'induit pas de modification significative de l'expression du CMHII ou du CD40, mais inhibe leur surexpression lorsque la CD est activée par du LPS. Elle entraîne à l'inverse une surexpression du PD-L2, et ceci même en dehors d'une stimulation des CD par un TLRL.

En présence d'Arginine, nous avons pu observer une augmentation du CD40, mais également du CD86, sans modification de l'expression du PD-L1 et du PD-L2 (Figure 41). Ceci est en accord avec les propriétés immunostimulantes décrites pour l'arginine. Les résultats obtenus pour les deux métabolites permettent de valider le test immunologique *in vitro* comme sensible pour l'évaluation des métabolites purifiés.

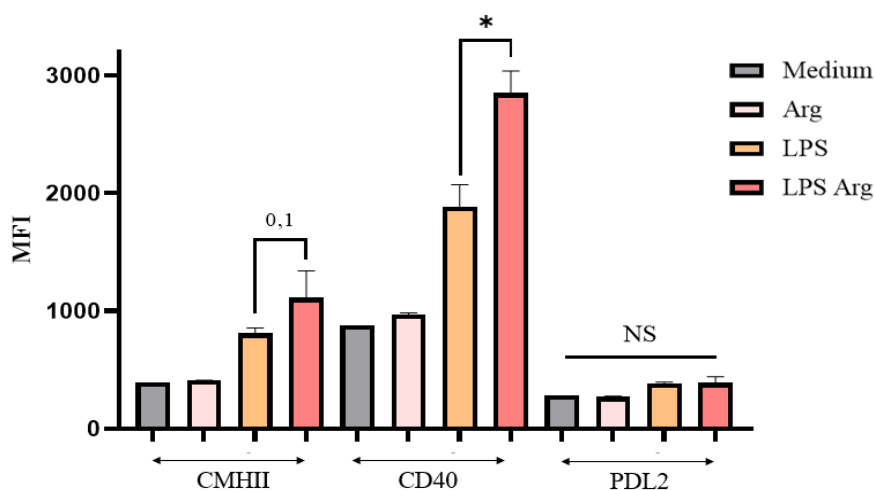


Figure 41 - Effet de l'arginine sur l'expression des différents marqueurs membranaires. L'expression du CMHII et du CD40 est amplifiée par rapport à la condition LPS seule, sans modification de l'expression du PD-L2. L'arginine seule n'amplifie pas l'expression des marqueurs membranaires.

➤ 1.5. Validation du test sur surnageants complexes

La sensibilité d'un test mis au point sur un métabolite purifié, peut-être différente lorsque l'on travaille en milieu complexe. Les variations fines peuvent alors être plus difficiles à observer, notamment parce l'effet d'un métabolite pourrait être masqué par l'ensemble des autres métabolites. Nous avons donc évalué si nous étions capables de mettre en évidence des modulations de l'activation et de la maturation de la CD induite par la surexpression d'un métabolite au sein d'un SN bactérien complexe par le test immunologique *in vitro*. Pour cela, nous avons utilisé deux approches :

- L'une dans lequel nous avons évalué les modulations induites par l'ajout d'un métabolite purifié, la Kynurénine, en plus du SN de culture de la bactérie CHA.
- Et un modèle de souche de Pa, également la souche CHA, bio-ingéniérées sur la voie métabolique du Tryptophane.

▪ 1.5.1. Matériel et Méthode

La souche CHA, souche de référence au laboratoire, a été isolée chez un patient atteint de mucoviscidose au CHU Grenoble-Alpes. Cette souche a été bio-ingéniérée pour entraîner une accumulation de Kynurénine par la délétion du gène KynU qui code pour une Kynuréninase, enzyme responsable de la métabolisation de la Kynurénine en Anthranilate, elle est alors appelée CHAΔKynU (Figure 42). Les souches CHA et CHAΔKynU ont été cultivées comme les souches de la banque en milieu SCFM, et la croissance a été stoppée en phase exponentielle et en phase stationnaire. Les SN ont été collectés et nous avons réalisé une déprotéinisation au méthanol.

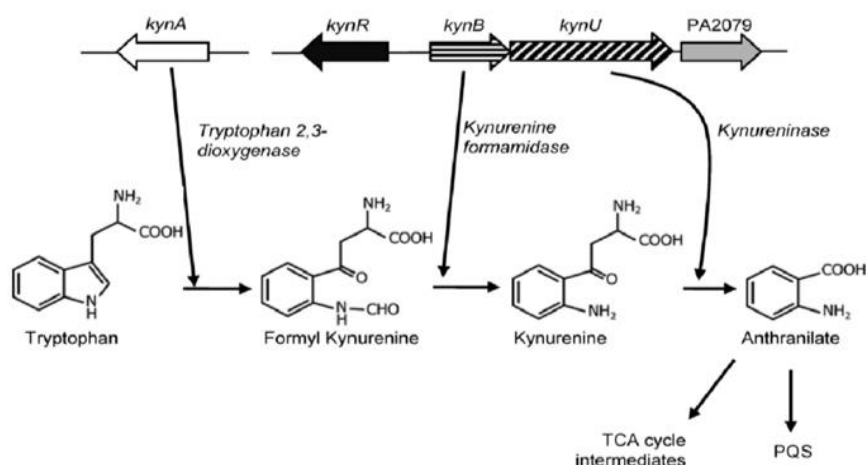


Figure 42 - Voie métabolique et enzymes impliquées dans la métabolisation du tryptophane (adapté de la thèse de Charlotte Genestet). Le tryptophane est métabolisé par l'enzyme KynA en Formylkynurénine puis en Kynurénine par la KynB et enfin en Anthranilate par la KynU. L'Anthranilate est un précurseur des molécules du QS chez Pa. La souche CHAΔKynU a perdu la capacité à produire l'enzyme KynU et à métaboliser la Kynurénine en Anthranilate qui va alors s'accumuler.

Afin de s'assurer que la délétion induite chez la souche de Pa était bien effective, nous avons réalisé un dosage du tryptophane et de la Kynurénine dans le SN de culture par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). La méthodologie exacte de cette technique est détaillée dans le chapitre III. En parallèle, les SN déprotéinisés des souches CHA et CHAΔKynU ont été évalués par le test immunologique *in vitro*. Ils ont été ajoutés à la culture des CD sous activation LPS, à raison de 50μl/ml. Pour la dernière condition 168 μM de Kynurénine ont été ajoutés, en plus du SN de la souche CHA.

1.5.2. Evaluation de la sensibilité du test sur SN bactériens.

Concernant la caractérisation par LC-MS/MS, nous avons pu observer une diminution de la concentration en Tryptophane dans le SN de la souche ΔKynU par rapport à la souche WT, et une augmentation de la concentration en Kynurénine (Figure 43 A). Ce qui valide la construction de la souche CHAΔKynU.

La caractérisation des SN par le test immunologique a permis d'observer dans la condition CHA + Kynurénine purifiée, une diminution de l'expression du CMHII, du CD86 et du PDL1 mais également une augmentation de l'expression du PDL2 (Figure 43 B). Ceci est concordant avec les résultats obtenus lors de l'évaluation de la Kynurénine purifiée dans le test immunologique *in vitro*. Les mêmes observations ont pu être réalisées lors de la comparaison de la souche WT CHA avec le SN de la souche bio-ingénierée, CHAΔKynU, entraînant une accumulation de Kynurénine. Ces résultats valident la sensibilité du test immunologique *in vitro* en milieu complexe et nous ont

permis de passer à l'évaluation des capacités immunomodulatrices de l'ensemble des souches cliniques de la banque.

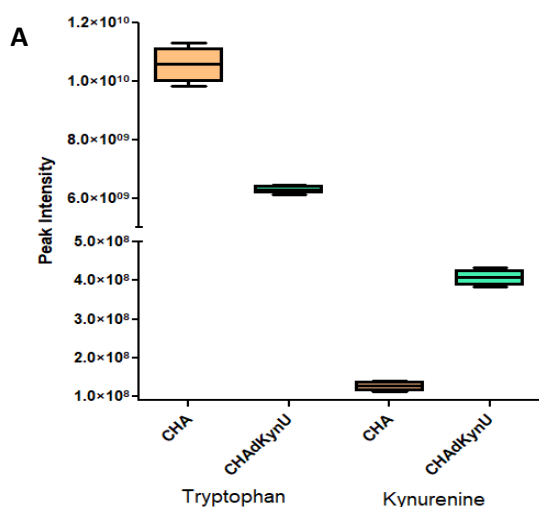
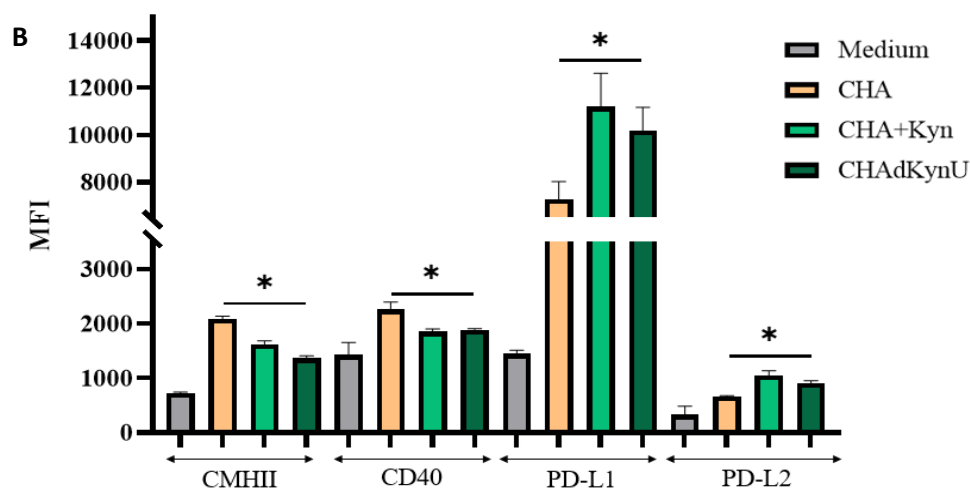


Figure 43 :
Validation de la construction de la souche *CHAΔKynU* par dosage du Tryptophan et de la Kynurénine en LC/MS-MS (A).
Validation de la sensibilité du test immunologique in vitro sur milieu complexe par analyse de la modulation de l'expression des marqueurs membranaires en présence de SN de souche WT CHA, bio-ingénierée *CHAΔKynU* ou en présence de Kynurénine purifiée par CMF (B).



2. Immunomodulations induites par les métabolites excrétés pendant les phases exponentielle et stationnaire de croissance sur la CD

➤ 2.1. Matériel et Méthode

Nous avons analysé l'impact des SN des souches de l'ensemble de la banque, et donc leur exométabolome collecté pendant la phase de croissance exponentielle et en début de phase stationnaire, sur l'activation et la maturation des CD par CMF. Les données ont été analysées par le logiciel Flow Jo v10.8.1. Les analyses ont été réalisées selon la hiérarchie présentée sur la figure 38. Afin de diminuer la variabilité inter-expérimentations, nous avons normalisé l'expression de chaque marqueur membranaire par l'expression obtenue en présence de LPS uniquement. Les analyses statistiques ont été réalisées sur R studio. L'analyse des propriétés immunomodulatrices des souches a été effectuée en séparant les phases de croissance. Pour chaque phase, une analyse

ACP a été réalisée et nous avons évalué quelles étaient les variables qui permettaient de discriminer les SN des souches pour chaque composante. Enfin nous avons réalisé une clusterisation par deux méthodes non supervisées, kmeans et HCPC (Hierarchical Clustering, Partitional clustering) (cf chapitre III).

➤ 2.2. Immunomodulations médiées par les métabolites pendant la phase de croissance exponentielle

Une première analyse effectuée sur la maturation et l'activation de la CD induite par les surnageants collectés au cours de la phase de croissance exponentielle a montré une séparation importante des souches des patients, notamment sur la composante 1 avec un score supérieur à 60% (Figure 44). La séparation des souches sur cet axe a été faite en prenant en compte l'ensemble des variables considérées, à savoir le CMHII, le CD40, le CD86, le PD-L1 et le PD-L2 qui sont toutes orientées dans la même direction (Figure 45A et B). Ainsi, l'ensemble des souches qui sont à gauche de l'axe, excrètent dans leur SN des métabolites responsables d'une faible expression de l'ensemble des marqueurs, à l'inverse celles à droite entraînent une expression de plus en plus marquée des marqueurs membranaires. Les résultats obtenus nous permettent de mettre en évidence que les souches cliniques de Pa sont capables d'induire une immunomodulation au niveau de la CD.

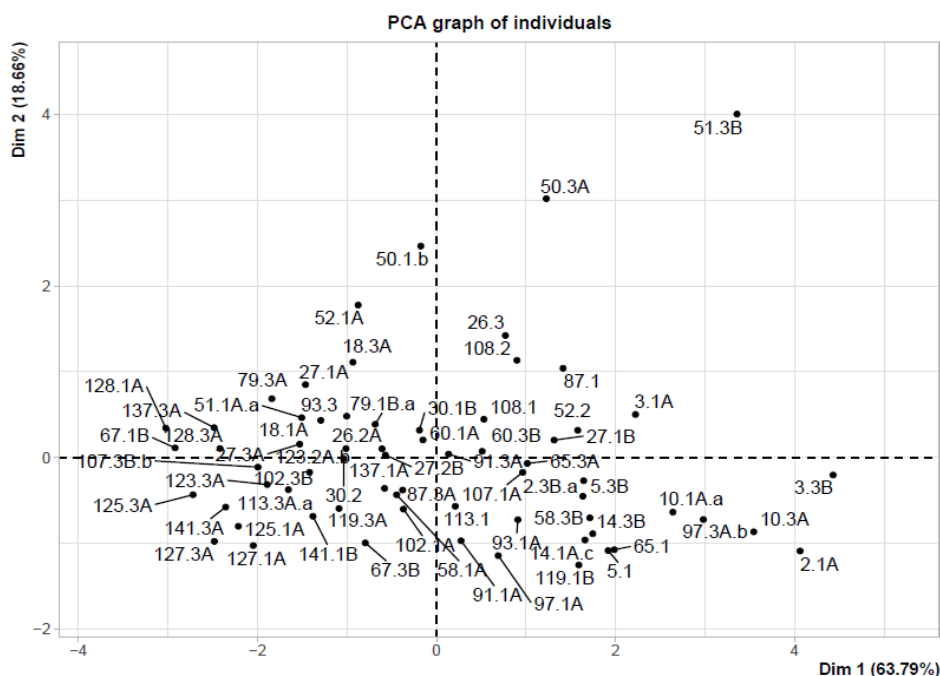


Figure 44 - Représentation en ACP des souches en fonction de l'expression des marqueurs membranaires de la CD sous activation LPS modulées par la présence des SN des souches collectés en phase exponentielle de croissance. Les variables évaluées sont le CMHII, les molécules de co-activation, CD40 et CD86 et de co-inhibition, PD-L1 et PD-L2. Les souches sont réparties selon différentes dimensions montrant d'importante séparations des souches avec 63,8% sur l'axe 1 et 18,7% pour la dimension 2.

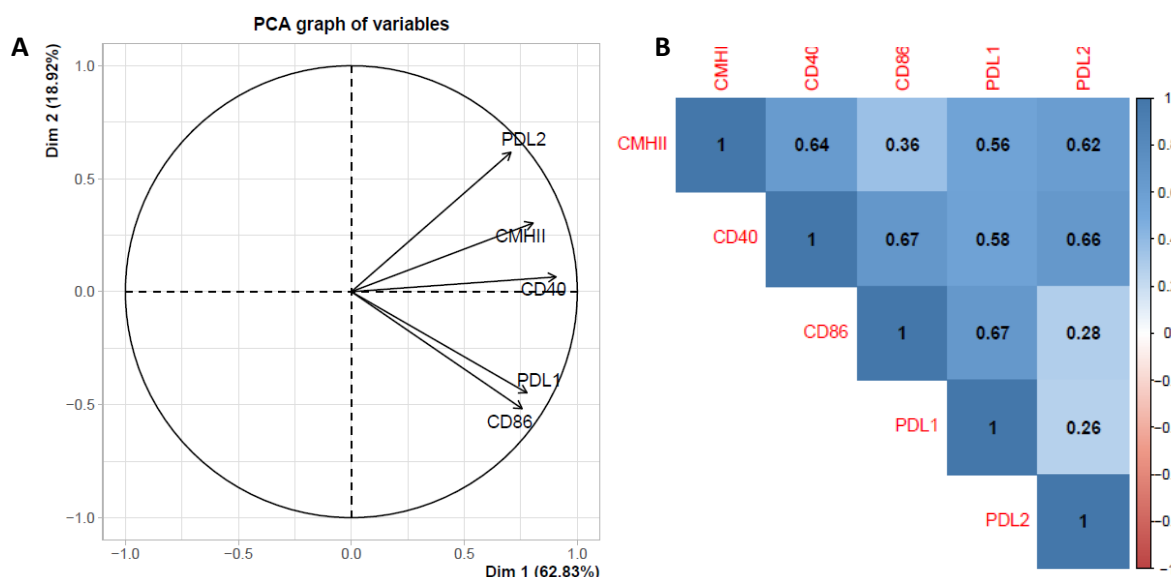


Figure 45 – Organisation des variables dans la séparation des souches dans l'ACP et observation de la corrélation inter-variables. La séparation des souches selon les différentes variables montre qu'elles sont toutes orientée à droite de la dimension 1. Les souches à droite de l'axe des ordonnées présentent donc une augmentation de l'expression des marqueurs membranaires et celles à gauche une diminution. L'évaluation de la corrélation entre les différentes variables montre également que toutes sont corrélées de façon plus ou moins marquée (B).

De façon intéressante, nous observons que la corrélation la plus faible est retrouvée entre le CD86 et le PD-L2, qui sont respectivement des marqueurs de co-activation et de co-inhibition. Cette différence est moins marquée avec des marqueurs de co-activation comme le CD40, ceci peut être expliqué par une variation de l'expression de ce marqueur qui est beaucoup plus faible que celle que nous pouvons observer pour le CD86 sous activation. Concernant le PD-L1, ce marqueur en plus d'être une molécule de co-inhibition a une expression qui est corrélée à l'activation de la CD et pas uniquement corrélée à l'effet de l'immunomodulation induite par le SN sur la CD.

Afin d'identifier les souches partageant les mêmes caractéristiques et comprendre quelles sont les variables qui caractérisent chaque type de souches, nous avons réalisé une clusterisation. Nous avons tout d'abord déterminé le nombre de clusters, par la méthode des kmeans, nombre également validé par une analyse HCPC. Ainsi, deux clusters ont pu être mis en évidence par analyse HCPC (Figure 46A). Ces résultats ont été confirmés par une clusterisation par la méthode des kmeans représentée sous la forme d'un dendrogramme et montrant une répartition similaire des isolats (Figure 46B). La description de chaque cluster par les différentes variables a montré que le cluster 1 est associé négativement à l'expression du CD40, du CD86, du PD-L1 et du PDL2 alors que le cluster 2 est associé à une expression positive de l'ensemble des marqueurs (analyse HCPC, p-value < 0.0001).

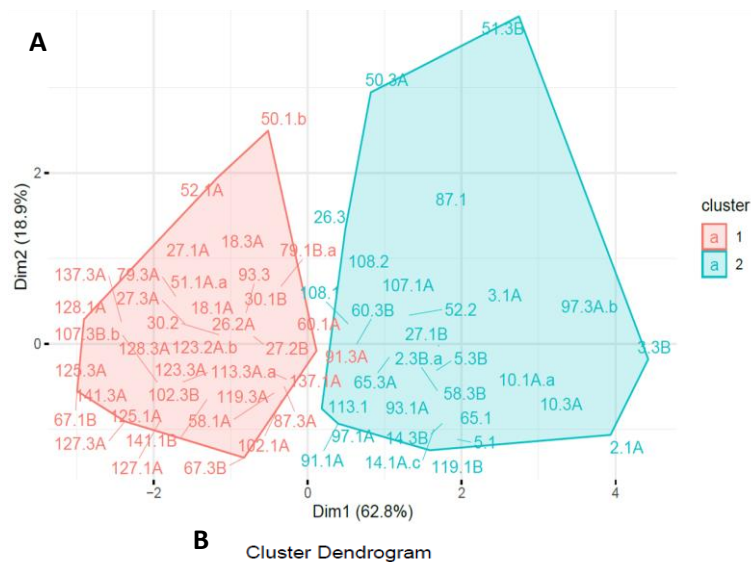
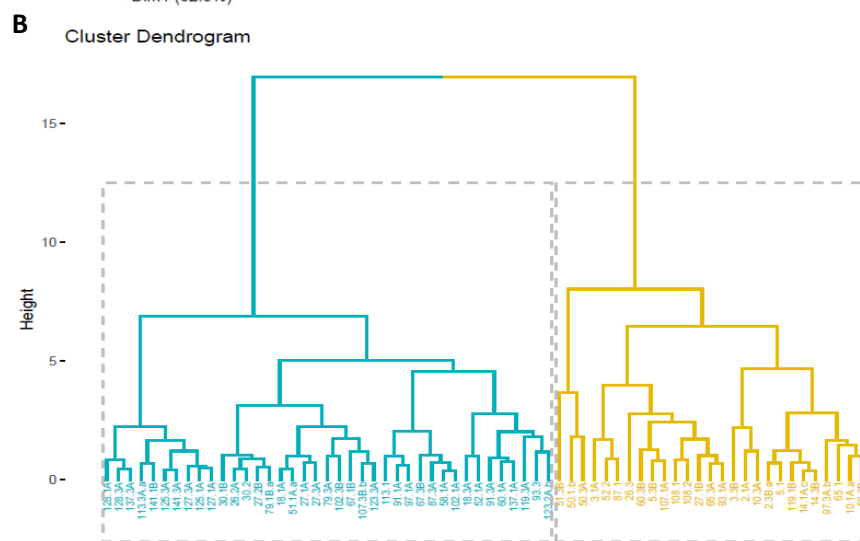


Figure 46 :
Représentation de la clusterisation des souches en phase de croissance exponentielle. Une immaturité de la CD est observée dans le cluster 1 avec une diminution de l'expression du CMHII, du CD40, du CD86, du PDL1 et du PDL2, contrairement au cluster 2 (A).

La séparation observée dans la figure A est validée par un deuxième algorithme, celui des kmeans représenté par un dendrogramme (B).



Des différences ont ainsi pu être mises en évidence sur l'expression des différents marqueurs membranaires (normalisée par l'expression dans la condition LPS seul) entre les deux clusters (test de Mann Whitney, p -value < 0.0001) (Figure 47). Ceci vient confirmer les résultats obtenus par l'analyse HCPC. L'expression de chacun des marqueurs membranaires est plus importante dans le cluster immunostimulant. Les molécules de co-activation et de co-inhibition sont diminuées par rapport à la condition LPS seul dans le cluster immature, ce qui met en évidence un effet inhibiteur des métabolites contenus dans les SN de culture. Cependant, il est intéressant de noter que cette inhibition n'est pas médiée par une diminution de l'activation de la CD puisque l'expression du CMHII est encore amplifiée par rapport à la condition LPS.

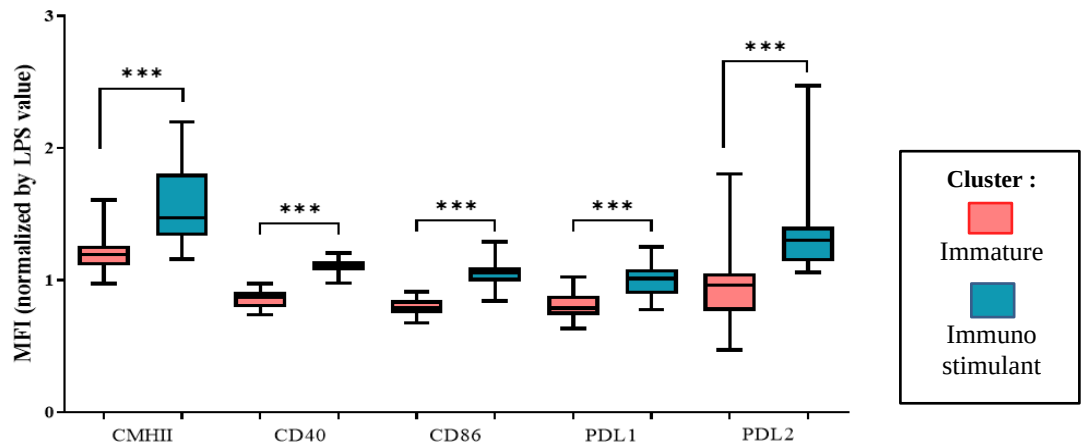


Figure 47 - Expression des marqueurs membranaires des CD en fonction des clusters immature et immunostimulants. Une normalisation a été effectuée par rapport à l'expression des marqueurs dans la condition LPS seul. La MFI de tous les marqueurs est augmentée par les SN des souches du cluster immunostimulant. On note une diminution de l'expression de ces mêmes marqueurs par les SN des souches du cluster immature par rapport à la condition LPS seul (valeur inférieure à 1). Cette inhibition n'est pas médiée par une diminution de l'activation de la CD puisque la MFI du CMHII est encore amplifiée par rapport à la condition LPS. (*** : p-value < à 0.0001)

Les différences observées dans l'expression des marqueurs membranaires peuvent être minimisées par les individus au centre de l'ACP. En effet, il est intéressant de noter que toutes les souches n'ont pas le même poids dans l'analyse. Un certain nombre de souches induisent ainsi une expression assez similaire des marqueurs membranaires alors qu'elles peuvent être séparées entre les différents clusters. Par rapport aux individus représentés en périphérie, ces souches entraînent une immunomodulation de la CD qui est moindre. Ces individus sont représentés en gris dans l'exemple théorique (Figure 48 A) et en gris ou bleu sur la représentation ACP (Figure 48 B). Ainsi, pour les expérimentations effectuées par la suite, nous nous sommes basés sur les individus les plus discriminants dans cette clusterisation, à savoir ceux représentés en rouge dans la figure 48 B.

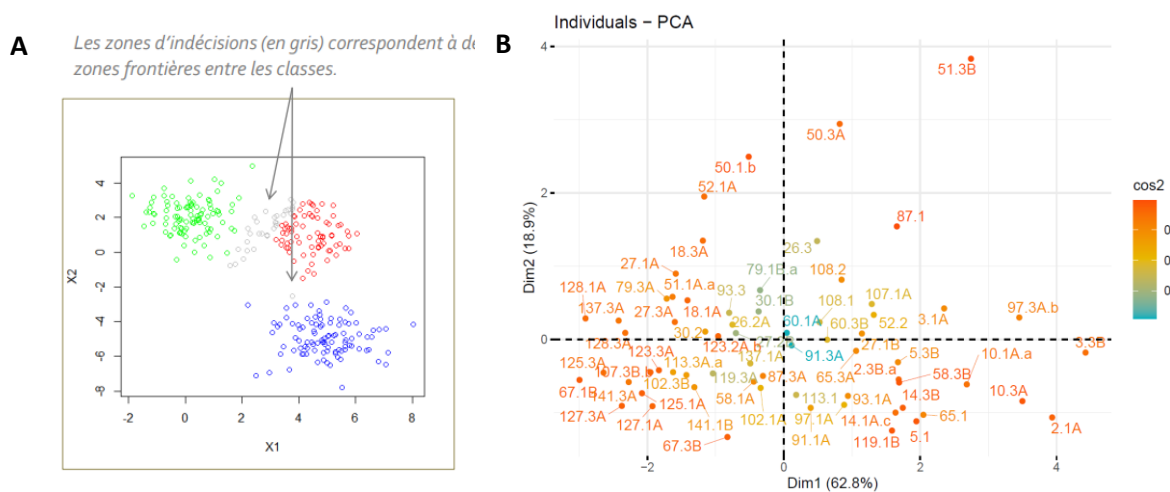


Figure 48 – L'ensemble des individus n'ont pas un poids significatif dans les représentations de type ACP. Importance des individus dans la clusterisation, représentation théorique (A). Les individus aux intersections de deux clusters représentés en gris présentent des caractéristiques communes aux différents groupes et ne sont pas ceux qui représentent le mieux le cluster. Cette observation est faite également pour les souches de notre étude, celles colorées en rouge ayant beaucoup plus de poids que celle colorées en gris ou en bleu (B).

Ainsi, différents types d'immunomodulations médiées par les métabolites excrétés ont pu être mis en évidence, au cours de la phase exponentielle de croissance :

- **Un cluster « immature »** regroupant les souches induisant une immaturité de la CD et donc des CD tolérogènes, entraînant une diminution de l'expression de l'ensemble des marqueurs de co-activation (CD40 et CD86) et de co-inhibition (PD-L1 et PD-L2) par rapport à la condition LPS seul.
- **Un cluster « immunostimulant »**, associé une augmentation de l'expression de ces mêmes marqueurs membranaires.

➤ *2.3. Immunomodulations induites par les métabolites excrétés par les souches sur la CD pendant la phase stationnaire de croissance*

La même analyse statistique a été effectuée pour évaluer les propriétés immunomodulatrices des souches en début de phase stationnaire. Nous avons ainsi pu observer des différences entre les deux phases de croissance dans l'activation et la maturation des CD et donc des différences entre les métabolites produits. En effet, par rapport à la phase exponentielle, un troisième cluster de souches a pu être mis en évidence (figure 49). Cette clusterisation a été validée par une deuxième analyse par CAH, représentée par un dendrogramme (Figure 50).

Les SN du 1er cluster induisent, comme en phase de croissance exponentielle, une diminution de l'ensemble des marqueurs membranaires et de la même façon les SN du 3ème cluster induisent une forte expression de ces mêmes marqueurs. Le 2ème cluster, qui n'était pas présent lors de la phase de croissance exponentielle, présente des caractéristiques intermédiaires entre les deux autres clusters. La représentation en dendrogramme souligne la plus grande ressemblance entre les clusters 2 et 3 (figure 49). Le cluster 2 présente des caractéristiques du cluster 3 avec une forte expression du CMHII mais diffère par l'expression du CD86 qui est diminuée et de PD-L1, également diminuée malgré une CD fortement activée. Plus que la modulation de l'expression des deux précédents marqueurs, on retrouve une forte expression du PD-L2 mettant en évidence une augmentation de la production de métabolites induisant l'expression du PDL2 au cours de la phase de croissance stationnaire (analyse HCPC, p-value < 0,001).

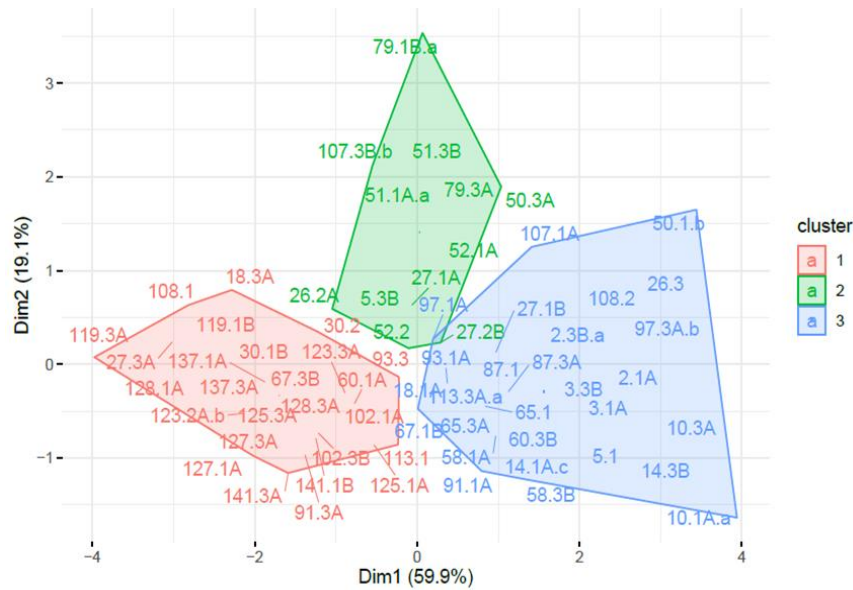


Figure 49 - Représentation de la clusterisation des souches en phase de croissance stationnaire. Un troisième cluster a pu être identifié avec les SN de culture des souches de la phase stationnaire. Un cluster « immature » dans lequel les SN entraînent une diminution de l'expression de l'ensemble des marqueurs membranaires et deux clusters « immunostimulants » qui sont responsable d'une augmentation de l'expression de l'ensemble des marqueurs de co-activation et de co-inhibition mais qui diffèrent quant à l'expression du PD-L2 avec un cluster immunostimulant PD-L2^{High} et un cluster immunostimulant PD-L2^{Low}.

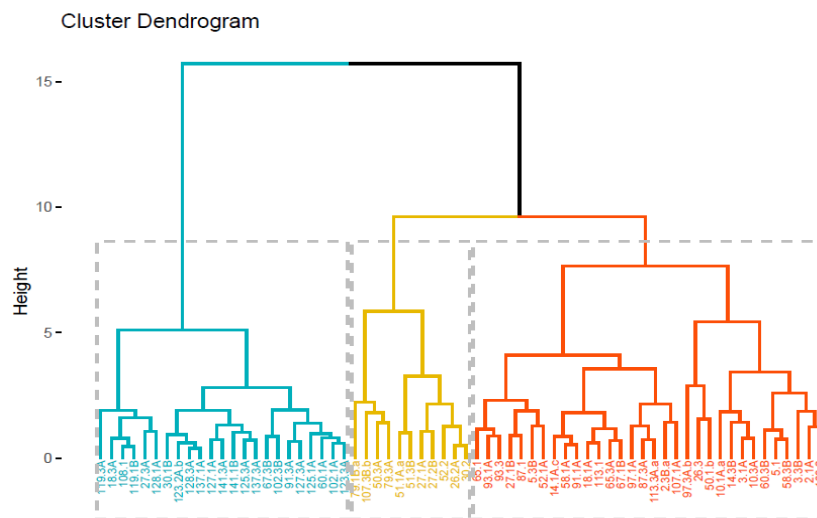


Figure 50 – Validation des Clusterisations obtenues par un deuxième algorithme. L'appartenance des SN obtenus pour chaque souche aux différents clusters a été confirmée par la méthode des kmeans représentée par un dendrogramme. On note que deux clusters sont plus proches en termes de caractéristiques, cluster jaune et rouge qui correspondent aux clusters immunostimulants PD-L2^{High} et PD-L2^{Low}.

De la même façon que pour la phase de croissance exponentielle, nous avons validé ces résultats par des analyses univariées pour chaque marqueur membranaire. Les trois clusters ont été comparés par ANOVA (test de Kruskal-Wallis, p -value < 0.0001) puis les clusters ont été comparés deux à deux (test de Mann Whitney) (figure 51). Ces résultats montrent que les SN des souches du cluster immature diminuent l'expression de tous les marqueurs membranaires par rapport à la condition LPS seul, à l'exception du CMHII. Si entre les clusters immunostimulants PD-L2^{High} et PD-L2^{Low}, le marqueur dont l'expression diffère le plus selon les résultats de l'ACP est comme nous l'avons observé : le PD-L2, nous avons également observé que les SN des souches du cluster immunostimulant PD-L2^{High} entraînent une expression intermédiaire de CD86 et une expression faible du PD-L1.

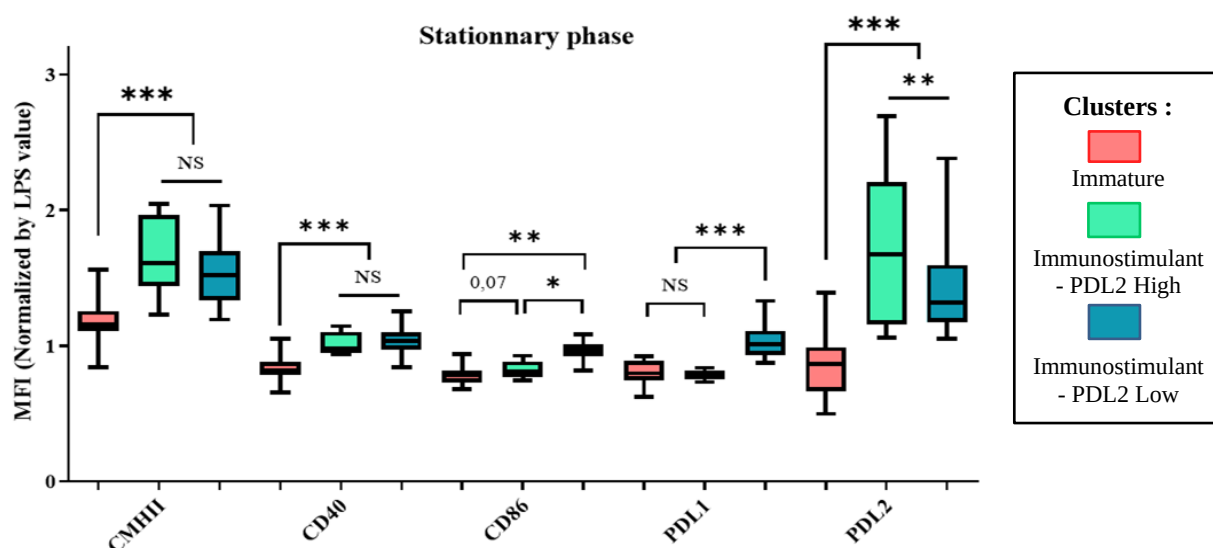


Figure 51 - Expression des marqueurs membranaires à la surface des CD modulée par les SN des souches appartenant aux différents clusters identifiés en ACP. L'expression du CMHII varie selon les clusters mais n'est pas diminuée par rapport à la condition LPS seul, contrairement à ce que l'on observe pour les molécules de co-activation et de co-inhibition avec les SN des souches du cluster immature. Une expression similaire du CD40 est observée entre les clusters immunostimulants alors qu'une diminution de l'expression du CD86 et du PD-L1 mais également une augmentation de l'expression du PD-L2 sont induites par les SN des souches du cluster immunostimulants PD-L2^{High}.
 *** : p -value < 0,0001, ** p -value < 0.01, * p -value < 0.05 et NS : non significatif

L'expérience a été reproduite sur l'ensemble des souches de la banque de façon indépendante, et des résultats similaires ont été obtenus sur la clusterisation avec 83% des souches qui appartenaient au même cluster. Parmi les 11 souches ayant changé de cluster, la plupart faisaient partie des individus ayant peu de poids dans l'ACP (Figure 48) qui ont pu « basculer » d'un cluster à l'autre. Seules 5 souches ont présenté des caractéristiques très différentes en termes de modulation des CD entre les 2 expérimentations.

En conclusion, au cours de la phase stationnaire de croissance, nous avons pu mettre en évidence 3 types d'immunomodulations médiées par les métabolites excrétés par les bactéries :

- **Un cluster « immature »**, déjà mis en évidence au cours de la phase de croissance exponentielle, regroupant donc les souches induisant une immaturité de la CD et donc des CD tolérogènes, entraînant une diminution de l'expression de l'ensemble des marqueurs de co-activation (CD40 et CD86) et de co-inhibition (PD-L1 et PD-L2) par rapport à la condition LPS seul.
- **Deux cluster « immunostimulants »**, associés à une augmentation de l'expression des marqueurs membranaires de co-activation et présentant une expression variable du PD-L2. Par la suite, ils seront donc identifiés comme **PD-L2^{High}** et **PD-L2^{Low}**.

➤ 2.4. Discussion : rôle du PD-L2 dans la régulation de l'immunité

La surexpression du PD-L2 à la surface des CD, induite par l'exométabolome des souches, peut entraîner différents types de polarisation du LT. Le PD-L2 est un ligand du récepteur PD-1 présent notamment à la surface des lymphocytes activés. L'axe médié par PD-1 est très largement décrit, dans le cadre des cancers, pour ses propriétés inhibitrices sur la réponse cellulaire T. En effet, la découverte des points de contrôles immunitaires par James Allison dans les années 90 a permis le développement de nouvelles thérapies, les immunothérapies, pour restaurer l'immunité tumorale²³⁷. Cependant le rôle exact du PD-L2 est actuellement moins connu que celui du PD-L1, autre ligand du récepteur PD-1. Il a été montré que l'induction de leur expression était différemment médiée par TLR4 et STAT1 pour le PD-L1 et l'IL-4R et STAT6 pour le PD-L2, ainsi les lymphocytes Th1 et Th2 régulent de façon différentielle l'expression de ces deux ligands à la surface des macrophages inflammatoires, ce qui les impliqueraient dans la régulation ces deux voies de façon distinctes²³⁸.

De façon plus générale, l'implication des points de contrôles immunitaires dans la réponse aux infections a été moins étudiée. Pourtant cette approche permettrait de restaurer l'immunité anti-infectieuse notamment au cours des infections chroniques. Dans les infections à Pa, une étude menée par Patil NK. et al., a montré que l'utilisation des anticorps anti-PD-L1 permettait de restaurer une immunité cellulaire T CD4 et CD8, augmentant la clairance bactérienne et améliorant la survie sur un modèle d'infections de brûlures par Pa²³⁹. Des résultats discordants ont été décrits sur l'impact de l'expression du PD-L2 dans l'immunité anti-infectieuse. Deux études ont décrit l'implication du PD-L2 au cours des infections à *Shistosoma spp.*, mettant en évidence l'inhibition de la réponse cellulaire T ainsi qu'une corrélation avec le développement de formes sévères de la maladie^{240,241}. Deux autres études portant sur les infections à *Mycobacterium tuberculosis* (MT), ont montré des résultats similaires. Mendoza-Coronel E. et son équipe ont montré que l'exposition

à des mycobactéries non tuberculeuses pouvait induire une forte expression du PD-L2 sur les CD, responsable d'une diminution de l'immunité développée après vaccination par le BCG²⁴². Il a également été montré que l'infection à MT entraîne une augmentation de l'expression de PD-L1 et PD-L2 directement sur les LT et que l'utilisation d'anticorps anti-PD1 permettait de restaurer leurs fonctions effectrices²⁴³. A l'inverse, plusieurs études ont montré un rôle favorable de PD-L2 au cours des infections. Contrairement aux effets anti-inflammatoires qui lui sont décrits, dans un modèle de Leishmaniose il a été mis en évidence que les souris KO pour PD-L2 présentaient une maladie plus sévère avec une extension des lésions cutanées et une augmentation de la charge parasitaire. Ces résultats sont opposés avec ceux obtenus pour les souris KO pour PD-L1 qui présentaient une diminution de la réponse Th2, favorable pour lutter contre le parasite et ainsi diminuer la croissance des lésions cutanées²⁴⁴. Ceci est en accord avec le rôle de PD-L1 et PD-L2 dans la régulation des réponse pro Th1 ou Th2. Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle d'infection à *Fasciola hepatica*. Au cours de cette infection, Stempin CC. et son équipe ont montré que de nouveau, les souris KO pour PD-L2 présentaient une susceptibilité plus importante à l'infection ainsi qu'une diminution de leur survie. PD-L2 aurait ainsi la capacité de contrôler la réponse Th1 dans les phases précoces de l'infection et permettrait une réponse équilibrée entre Th1 et Th2 favorable au contrôle de l'infection²⁴⁵. Enfin, il a été montré dans les infections par *Plasmodium falciparum* que l'expression de PD-L2 à la surface des CD était corrélée à une parasitémie plus faible²⁴⁶. Deux mécanismes peuvent expliquer l'implication de PD-L2 dans l'établissement d'une immunité cellulaire médiée par les LT CD4⁺ : la présence de PD-L2 empêcherait l'activation de PD-1 par PD-L1 et régulerait cet axe²⁴⁶, mais il permettrait également une expression de ICOS plus importante à la surface des LT, récepteur dont la liaison à son ligand induit un signal de co-stimulation induisant une augmentation de la survie et de la prolifération des LT^{246,247}. Il est également impliqué dans la polarisation de la réponse immunitaire notamment pro Th2, et est nécessaire au développement d'une réponse Th17 efficace^{247,248}.

Ainsi, le PD-L2 peut être délétère au développement d'une réponse immunitaire efficace en activant la voie médiée par PD1 entraînant une immunosuppression au niveau du LT. Cependant, il a également déjà été décrit pour ses effets favorables sur la réponse cellulaire T en participant au contrôle de la balance Th1 / Th2, mais également du développement de la réponse Th17 en augmentant l'expression de ICOS, et enfin en empêchant la fixation du PD-L1 au PD1 par un mécanisme de compétition qui empêcherait l'exhaustion des LT²⁴⁹. Pour mieux comprendre la polarisation induite par les CD exprimant fortement le PD-L2 dans notre modèle d'infection à Pa, nous investiguerons l'effet de l'exométabolome des souches sur des co-cultures CD-LT ainsi que l'impact de la bactérie dans des modèles d'infection in vivo.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence que l'exométabolome des souches de Pa est capable d'induire différents phénotypes d'activation et de maturation des CD. Certaines souches entraînent une immaturité de la CD, et donc des CD tolérogènes, tandis que d'autres induisent une immunostimulation. Nous parlerons alors d'immunotype « immunosuppresseur » ou « immunostimulant ». Nous avons pu observer que les souches induisant une immunostimulation de la CD présentaient différents niveaux d'expression du PD-L2 dont l'effet favorable ou défavorable sur le développement de la réponse immunitaire est actuellement mal connu et semble dépendre du type d'infection étudié. Ceci peut avoir un impact majeur sur la réponse immunitaire développé par le patient pour faire face à l'infection et pourrait expliquer les différences observées entre les patients concernant l'état de leur fonction respiratoire.

Même si l'on peut penser que les souches du cluster immunostimulant entraîneront majoritairement la formation de lymphocytes effecteurs et que les souches du cluster immature pourraient conduire majoritairement à la génération de lymphocytes T régulateurs, il est entendu que nous ne pouvons pas conclure sur les propriétés immunomodulatrices des différentes souches à partir de la caractérisation des CD uniquement, nous avons donc complété ces résultats par l'analyse de la polarisation des lymphocytes T *in vitro* et *in vivo*.

3. Evolution des propriétés immunomodulatrices des souches au cours de la croissance bactérienne.

Si l'on s'intéresse à l'évolution des capacités immunomodulatrices de nos isolats entre les phases de croissance exponentielle et stationnaire, on voit majoritairement que les souches appartenant à un cluster en phase de croissance exponentielle restent dans ce même cluster en phase de croissance stationnaire (Figure 52). Ceci confirme que les capacités immunomodulatrices des souches apparaissent dès la phase de croissance exponentielle.

Certaines souches produisent cependant des métabolites ayant des propriétés immunostimulantes ou immunosuppressives seulement en phase de croissance stationnaire. Ce phénomène est observé pour les souches appartenant au cluster immature en phase exponentielle de croissance puis appartenant en phase stationnaire, aux clusters immunostimulants PD-L2^{High} et PD-L2^{Low}. Ceci peut signer un changement du métabolisme de la souche entre les deux phases. Il est moins fréquent d'observer une production de métabolites immunosuppresseurs à partir de la phase stationnaire par des souches catégorisées comme immunostimulantes en phase exponentielle de croissance. Une partie des modifications observées peuvent également être dues aux souches ayant peu de poids dans l'ACP, tel que présenté sur les figures 48 A et B.

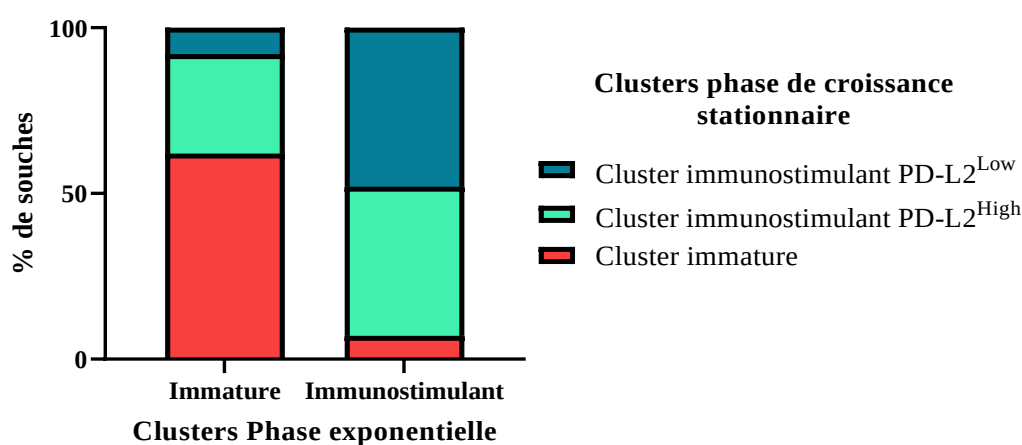


Figure 52 - Evolution des capacités immunomodulatrices entre les phases de croissance exponentielle et stationnaire. La majorité des souches appartiennent aux mêmes clusters en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire, ceci montre qu'elles commencent à produire des métabolites immunomodulateurs à partir de la phase de croissance exponentielle. Il est à noter que 38% des souches produisent des métabolites immunostimulants à partir de la phase de croissance stationnaire.

4. Etude d'une évolution vers un phénotype immunologique commun au cours du temps.

Nous avons également évalué si les souches changeaient de cluster immunologique entre les isolats Précoces et Tardifs et si l'on pouvait alors observer une convergence des isolats Précoces vers un phénotype immunologique particulier au stade tardif. Sur la représentation ACP présentée sur figure 53, les isolats Précoces et Tardifs sont représentés de manière homogène sur les deux dimensions et les ellipses qui entourent chaque groupe sont superposées. Nous pouvons en conclure qu'aucune convergence d'évolution ou trajectoire évolutive commune des isolats Précoces au cours du temps ne peut donc être mise en évidence. La majorité des souches précoces et tardives appartiennent au même cluster, seulement 7 clones ont changé d'immunotype sur les 33. Il est intéressant de noter que, pour les souches ayant changé de clusters, il s'agissait plus souvent d'un passage du cluster immunostimulant vers le cluster immature (60%). Il semblerait que la durée de l'infection ne joue aucun rôle sur la constitution des différents clusters, les deux groupes ayant une médiane de durée d'infection de 17ans. D'autres éléments semblent influencer l'adaptation de la souche à son environnement, sans que nous puissions savoir si cet élément dépend de la souche elle-même ou dépend du patient et par exemple de la pression immunitaire ou antibiotique qui a été exercée.

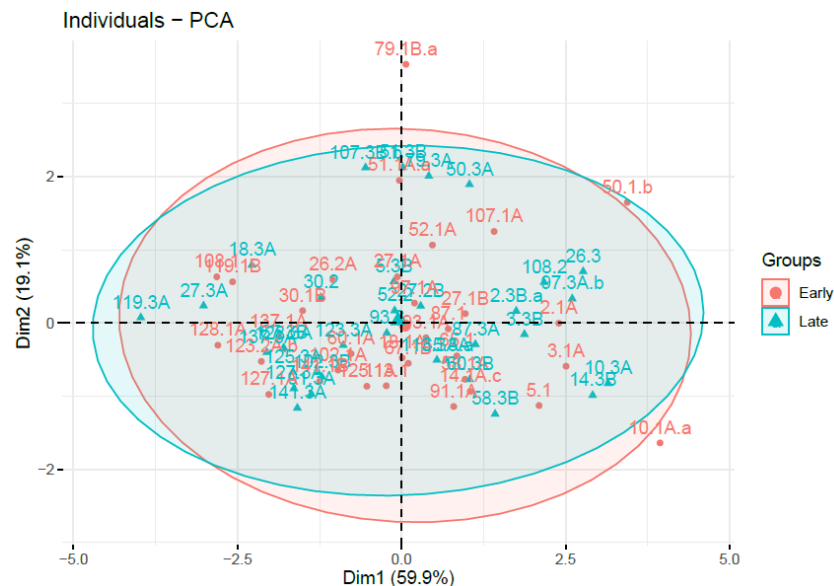


Figure 53 - Représentation des isolats Précoces (Early) et Tardifs (Late) en fonction de l'expression des différents marqueurs à la surface de la CD, en ACP. La superposition des deux ellipses met en évidence l'absence de convergence évolutive des isolats Tardifs par rapport aux isolats Précoces.

II. Evaluation de l'impact des métabolites excrétés sur la polarisation des LT

Après avoir identifié les immunomodulations induites par les métabolites excrétés sur les CD, nous avons cherché à caractériser le type de polarisation développées par les LT naïfs au contact de la CD mature et activée.

1. Matériel et Méthode

Le priming d'un T naïf et sa polarisation subséquente, dépendent de la stimulation antigénique mais aussi de la nature des co-stimulations reçues et des cytokines polarisantes produites par la CD. Pour étudier l'impact réel de la modulation des CD par l'exométabolome des souches de Pa sur l'immunité de l'hôte, nous avons analysé la polarisation T *in vitro*. Pour cela, un modèle de co-culture allogénique de CD et de LT CD4+ naïfs a été utilisé. La culture allogénique nous permet de nous affranchir d'une stimulation antigénique spécifique, nécessaire à l'activation des LT. Les CD ou BMDC (Bone Marrow Derived Dendritic Cells) sont issues de souris C57BL/6 et les LT naïfs sont issus de rate de souris Balb/c²⁵⁰. Le choix de l'espèce à son importance puisque les C57BL/6 favorisent la production de lymphocytes Th1 et que les Balb/c sont plutôt pro-Th2²⁵¹. Les DC2.4 étant issues de C57BL/6 nous les avons utilisées pour générer les BMDC.

Afin de générer des BMDC, les fémurs de souris C57BL/6 ont été collectés pour en extraire la moelle. Pour cela, les extrémités des os sont coupées afin d'obtenir un cylindre et la moelle est collectée. La suspension est recueillie puis les érythrocytes sont lysés par du Red Blood Cells Lysis Buffer, eBioscience™. Après lavage, le culot cellulaire est resuspendu en RPMI 10%SVF puis les cellules sont placées en plaque 6 puits à une concentration de 2 millions de cellules par puits. Pour orienter les cellules myéloïdes immatures vers la formation de BMDC, deux types de cytokines le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et l'IL-4 sont ajoutés selon le protocole suivant^{252,253} : à J0, le milieu est supplémenté de 20ng/ml de GM-CSF. A J3 de la culture, les cellules non adhérentes sont retirées et du milieu de culture frais contenant toujours 20ng/ml de GM-CSF est ajouté. A J6, la même manœuvre est réalisée avec du milieu de culture frais contenant 10ng/ml de GM-CSF et 5ng/ml d'IL4. La maturation des CD par ajout de LPS et des SN de culture est réalisée à J10 de culture. Les cellules adhérentes sont collectées et resuspendues à une concentration permettant d'obtenir 20 000 cellules dans 50µl de milieu de culture avant d'être placées en plaque 96 puits. L'activation et la maturation des CD sont effectuées en milieu de culture AIMV™ sur 36h par ajout de LPS (1µg/ml) puis sont ajoutées, soit l'exométabolome des souches cliniques, soit les métabolites purifiés, comme décrit pour le test immunologique *in vitro*. Les conditions ont été dupliquées afin qu'une partie des CD matures et activées soient mises au contact des LT naïfs selon un rapport de 1:5 et l'autre partie est collectée après 36h d'incubation pour être

analysée en CMF. Nous avons utilisé le même protocole et le même panel d'anticorps pour l'analyse de l'expression des marqueurs membranaires des BMDC que pour la caractérisation des DC2.4.

Les LT naïfs sont isolés à partir de rates de 6 souris Balb/c. Les souris, âgées de 5 à 10 semaines, permettent d'obtenir environ $3 \text{ à } 6 \times 10^6$ de LT naïfs par animal²⁵¹. Les rates sont prélevées et placées en milieu de culture RPMI. Pour extraire les cellules, les rates sont écrasées sur un filtre cellulaire de 70µm, rincé en RPMI. Après centrifugation, le culot est resuspendue dans 1ml de solution de Red Blood Lysis Buffer afin de lyser les érythrocytes puis la réaction est arrêtée par ajout de PBS 2% SVF. Les cellules sont ensuite comptées et ajustées pour une concentration de 1×10^8 cellules/ml pour être purifiées avec le kit EasySep™ Mouse Naïve CD4+ T Cell Isolation de Stemcell™, selon les recommandations fournisseur. Les cellules non retenues par l'aimant sont les lymphocytes T CD4 naïfs qui peuvent être collectés pour être mis en contact avec les CD activées, matures et préalablement irradiées par 30 Grey afin de bloquer leur prolifération. La co-culture est réalisée avec 20 000 CD et 100 000 LT dans 100µl dans un volume final de 200µl en plaque 96 puits. La polarisation des LT a été analysée par CMF en fonction de l'expression de marqueurs de surface, de facteurs de transcription (FT) et de la production de cytokines selon le panel 12 couleurs présenté sur le tableau X. Après 96h de co-culture, les lymphocytes T ont été collectés puis stimulés par PMA (50ng/ml) Ionomycine (1µg/ml) (Sigma) durant 4h en présence de GolgiStop™ (BD) (0,67µl/ml). Après stimulation un marquage extracellulaire est réalisé pendant 15min à l'abri de la lumière, à température ambiante. Le marquage des cytokines intra est réalisé après perméabilisation selon les recommandations du fournisseur (Kit Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer eBioscience™) Enfin, les cellules sont fixées au FACS™ Lysing solution (BD) avant analyse en CMF selon le panel d'anticorps en 12 couleurs présenté sur le tableau X.

Tableau X : Panel d'anticorps utilisé en CMF pour caractériser la polarisation des LT.

Fluochrome	Membranaire	Cytokines ou FT intracellulaire
APC-C7	CD45	/
FITC	CD3	/
PE	/	TFNa
PC7	CD25	/
PerCP-Cy5.5	CD4	/
APC-R700	/	IL-2
Alexafluor 647	/	FoxP3
BV421	/	IL-17
BV605	/	IL-4
BV711	/	IL-10
BV786	/	IFNg
V500	LIVE/DEAD™ Yellow	/

2. Impact de l'exométabolome des souches sur la polarisation des LT

A l'image du test immunologique sur les DC présenté plus haut, les T naïfs ont été mis en contact de DC préalablement activées par du LPS en présence de métabolites purifiés (Kyn 200µM) ou de SN provenant de souches représentatives de chaque immunotype, nommées par la suite : « Immunostimulante PD-L2^{High} », « Immunostimulante PD-L2^{High} », et « Immunosuppressive ». Nous n'avons pas pu interpréter les résultats concernant la souche « Immunostimulante PD-L2^{High} » car l'exométabolome de la souche induisait une mortalité trop importante sur les CD, comme cela est visible sur la figure 54. Nous observons une diminution drastique du nombre de CD en culture, et donc des cellules capables d'activer les LT. Nous n'avons pas observé l'induction d'une mortalité trop importante sur les DC2.4, ceci peut être dû au fait que nous avons travaillé sur une lignée de cellules. Ce paramètre serait donc à réévaluer sur des BMDC.

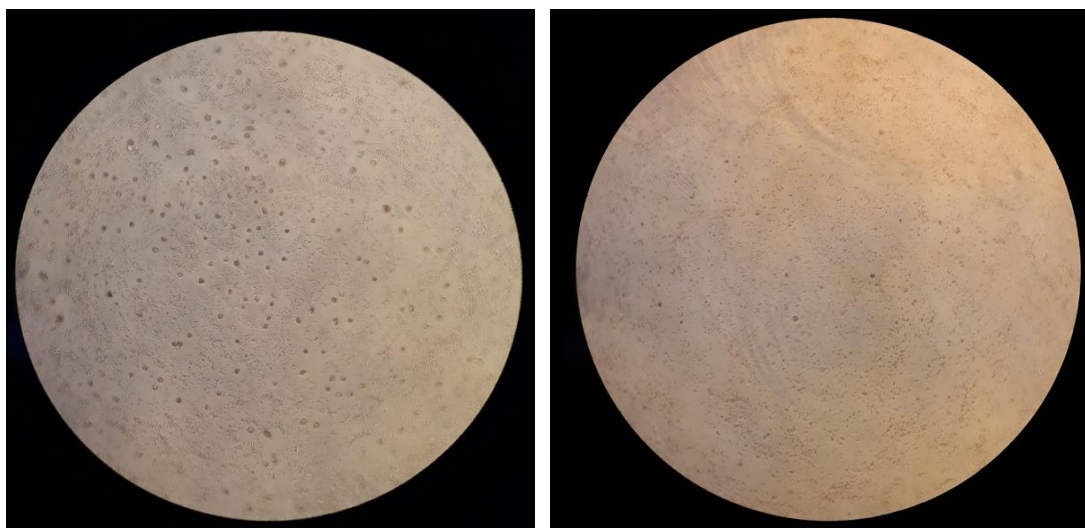


Figure 54 - Aspect des CD et des LT au cours de la co-culture en présence des SN de culture des souches. A gauche nous voyons au cours de la co-culture avec le SN de la souche suppressive la formation de cluster témoignant d'une prolifération lymphocytaire, à droite avec le SN de la souche « Immunostimulante PD-L2^{High} » marquée par proportion de CD beaucoup plus faible. La différence entre ces deux conditions suggère une cytotoxicité forte vis-à-vis des CD médiée par le SN de souche « Immunostimulante PD-L2^{High} ».

L'évaluation de l'expression des marqueurs de co-stimulation et de co-inhibition de la CD par CMF a mis en évidence une modulation de l'activation et la maturation induite par le LPS, par la Kynurénine mais aussi par les SN de culture (Figure 55). La Kynurénine a induit une diminution de l'expression du CMHII et du CD40. La souche « immunostimulante » n'a pas modifié l'expression du CMHII mais a entraîné une augmentation de l'expression du CD40. Des résultats opposés ont été montrés avec la souche « immunosuppressive », avec une augmentation de l'expression du CMHII mais une diminution du CD40. Nous n'avons pas observé de différence significative concernant l'expression du PD-L2. Ces résultats permettent de valider les observations

obtenues sur les DC2.4 et démontrent que les observations faites sur la lignée sont également valables sur les BMDC.

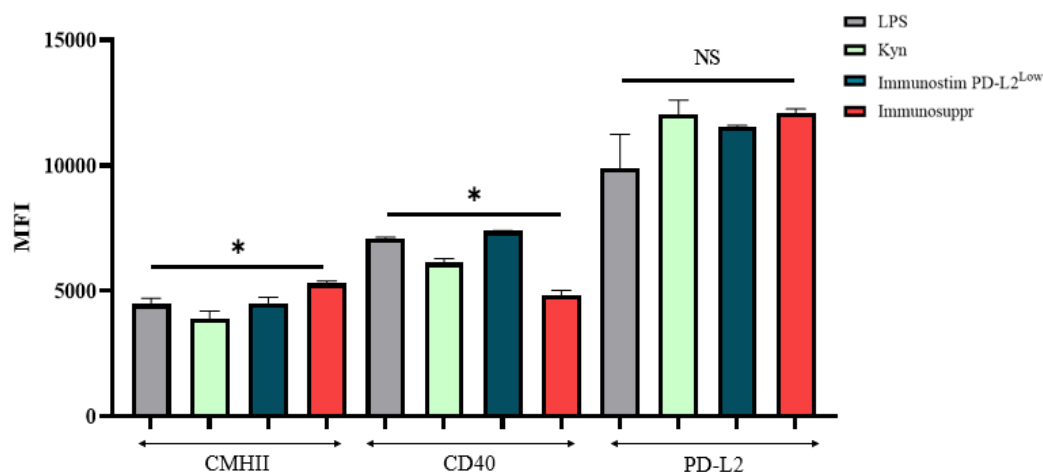


Figure 55 - Expression des marqueurs membranaires des BMDC sous activation LPS en présence de métabolites purifiés ou de l'exométabolome des souches. Une variation de l'expression du CMHII et du CD40 a pu être observée entre les souches, mais pas du PD-L2. La Kynurénine entraîne une diminution du CMHII et du CD40 par rapport à la condition LPS. La souche Immunosuppressive induit une augmentation du CMHII et une diminution du CD40 tandis que la souche Immunostimulante n'entraîne pas de modification de l'expression du CMHII et une faible augmentation du CD40 (* : p-value < 0.05, NS : non significatif)

Concernant la polarisation induite sur les LT, nous avons pu observer une diminution de la production d'IL-2 que ce soit par les souches « immunostimulantes » et « immunosuppressives », et une augmentation de la production d'IL-4 par rapport à la condition LPS seul. Ceci est en faveur d'une réponse immunitaire pro-Th2, comme cela a déjà été observé au cours des infections à Pa (Figure 56). Les résultats diffèrent entre les deux types de souches concernant les autres résultats. La souche « immunostimulante » entraîne une augmentation marquée de la production d'IL-17. A l'inverse elle diminue la production d'IL-10 par les CD4⁺ ainsi que la proportion de cellules CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ productrices d'IL-10. Les variations observées pour la souche « immunosuppressive » vont dans le même sens que celles observées pour la Kynurénine. Celle-ci diminue la production d'IL-17 mais augmente la proportion de cellules CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ productrices d'IL-10. Même si les tendances observées sur cette dernière expérience étaient similaires à celles obtenues lors des mises au point, celle-ci n'a été effectuée qu'une fois et sera à dupliquer.

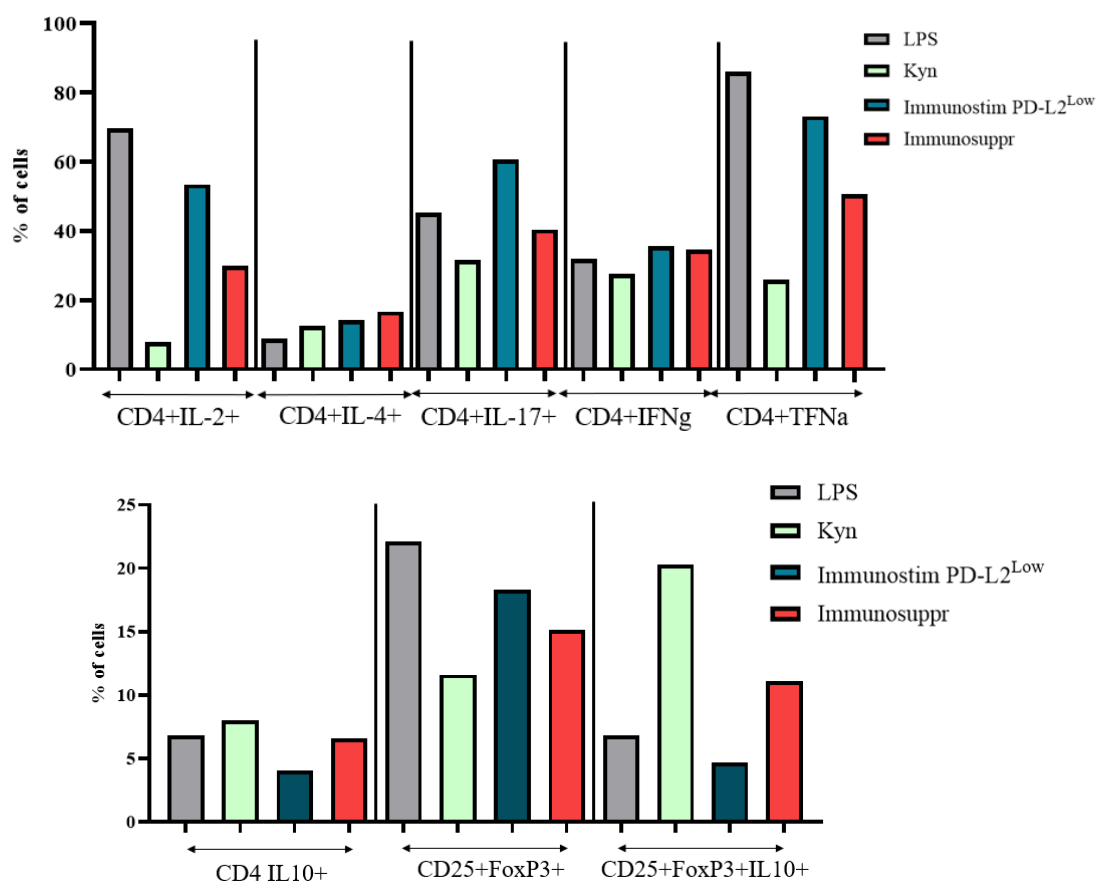


Figure 56 - Polarisation des LT obtenue in vitro, après contact avec les BMDC matures et activées en présence de la Kynurénine ou des SN des souches aux propriétés immunomodulatrices distinctes. Les différentes conditions testées sont faites en présence de LPS pour évaluer la modulation induite par le métabolite purifié ou les SN (Kyn plus LPS et SN plus LPS). Sur la partie haute du schéma sont présentés les LT effecteurs et sur la partie basse les LT aux propriétés plutôt anti-inflammatoires et les LT régulateurs. La Kynurénine diminue la production d'IL-2, d'IL-17 et de TNF α induite par le LPS, et entraîne une légère augmentation de la production d'IL-4, d'IL-10 et des CD25+FoxP3+IL-10+ (correspondant au Treg producteur d'IL-10). Le SN de la souche immunostimulante induit une diminution de la production d'IL-2 et de TNF α mais une augmentation de la production d'IL-17. Enfin, le SN de la souche immunosuppressive module la polarisation du LT de façon similaire à celle induite par la Kynurénine, dans une moindre mesure.

En somme, l'exométabolome des souches induit une polarisation Th2 plutôt que Th1, comme cela a été décrit dans la littérature (cf introduction). La souche immunostimulante induit une polarisation Th17 marquée, alors que la souche immunosuppressive induit une plus grande proportion de LT régulateurs producteur d'IL10.

III. Impact des capacités immunomodulatrices des souches sur la fonction respiratoire des patients infectés chroniquement par Pa

Nous avons montré que l'exométabolome des souches cliniques est capable de moduler l'immunité, notamment l'activation de la maturation de CD sous activation TLRL, sur des modèles *in vitro*. L'interaction et la modulation du système immunitaire par la bactérie pathogène est essentielle pour qu'elle puisse faire face au système immunitaire et puisse persister chez l'hôte. Différents mécanismes d'adaptation mis en place par Pa ont été proposés pour faire face à l'immunité du patient, mais ceux-ci sont encore insuffisamment décrits. Nous avons également observé que les souches de notre banque ne présentaient pas certaines des caractéristiques phénotypiques qui sont habituellement décrites comme nécessaire à l'instauration d'une infection chronique (cf chapitre I). L'investigation d'autres mécanismes d'adaptation qui pourraient mis en place par la bactérie est essentielle à la compréhension de l'interaction entre l'hôte et le pathogène mais également nécessaire à l'identification de nouvelles approches pour son élimination.

L'infection par des souches ayant différentes propriétés immunomodulatrices pourrait ainsi participer à l'évolution de l'état de santé respiratoire des patients qui souffrent d'infections chroniques. Les patients de cette cohorte ont pu être séparés en deux groupes : ceux présentant une fonction respiratoire plutôt instable, en déclin au cours du suivi et présentant un VEMS inférieur aux autres patients. Nous avons cherché à identifier s'il y avait un lien entre l'état de la fonction respiratoire des patients et l'infection par un des deux types de souches préalablement décrites : celles induisant une immaturité de CD et celles entraînant une immunostimulation. Pour ces analyses nous avons pris en compte uniquement les patients dont les souches Précoces et Tardives appartenaient au même cluster (n=26). En effet il est difficile de savoir si l'état de santé des patients découle de l'effet de la souche prélevée précocement ou s'il a plutôt été impacté par la souche prélevée à la fin du suivi. Nous avons alors pu montrer qu'il existait une corrélation statistiquement significative entre l'évolution de l'état de santé respiratoire des patients et les propriétés immunomodulatrices des souches (Test de Fisher, p-value = 0.004, OR : 0.0671, IC 95% [0.0046 ; 0.5541]). Ainsi, les souches induisant une immaturité de la CD infectent dans 80% des cas des patients présentant un déclin de leur fonction respiratoire au cours du temps alors que 81% des souches immunostimulantes PD-L2^{High} et PD-L2^{Low} sont retrouvées chez des patients ayant une fonction respiratoire stable au cours du temps (Figure 57). Cette corrélation peut suggérer un lien entre un défaut de contrôle de l'infection par le système immunitaire et le déclin des fonctions respiratoires au cours du temps. Ceci constituerait un mécanisme d'échappement mis en place par la bactérie pour persister et proliférer chez l'hôte, médié par l'exométabolome. Il est alors intéressant d'évaluer si le défaut de contrôle de l'infection observé préalablement pourrait occasionner une augmentation de la fréquence des exacerbations chez les patients de la cohorte.

L'infection par une souche immunostimulante PD-L2^{High} ou PD-L2^{Low} entraîne peu d'exacerbations dans 73% des cas. A l'inverse, l'infection par une souche « immunosuppressive » entraîne une instabilité de la fonction respiratoire (défini par un CV $\geq$ à 15%) dans 60% des cas (Figure 57). La diminution du contrôle de l'infection par le système immunitaire pourrait entraîner une augmentation de la fréquence des exacerbations chez les patients.

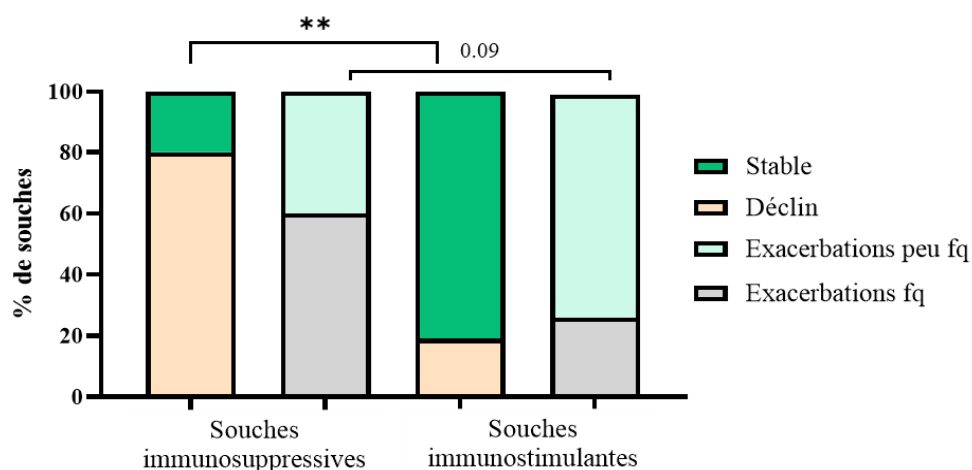


Figure 57 - Evaluation de l'impact des propriétés immunomodulatrices des souches sur la fonction respiratoire des patients. Les patients infectés par des souches immunosuppressives présentent un déclin des fonctions respiratoires et des exacerbations fréquentes dans 80% et 60% des cas respectivement. A l'inverse, ceux infectés par des souches immunostimulantes présentent une fonction respiratoire significativement plus stable et moins d'exacerbations. (** : p-value < 0.01, fq : fréquent)

Nous avons identifié deux types de souches immunostimulantes : PD-L2^{High} ou PD-L2^{Low}. Il est intéressant de noter que si aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les exacerbations et l'infection par une souche induisant une forte ou une faible expression du PD-L2 (test du Chi², p-value = 0.56), aucun des patients infectés par une souches immunostimulantes PD-L2^{Low} ne présente de déclin des fonctions respiratoires. Ceci met en évidence une association statistiquement significative (test exact de Fisher, p-value = 0.01), suggérant que l'infection par ce type de souches pourrait constituer un facteur protecteur pour les patients.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence une corrélation entre les immunomodulations, observées sur les CD, médiée par l'exométabolome des souches et l'évolution de la fonction respiratoire des patients au cours du temps ainsi que la fréquence des exacerbations. Les patients infectés par des souches induisant une immaturité de la CD présentent un déclin des fonctions respiratoires et plus d'exacerbations que les patients infectés par des souches immunostimulantes. La modulation du système immunitaire médiée par l'exométabolome que nous avons pu observer est à mettre en balance avec les facteurs de virulence de la bactérie. L'ensemble doit être pris en compte afin d'évaluer l'impact potentiel sur l'état de santé respiratoire des patients. Ces résultats indiquent une corrélation, qu'il est nécessaire d'investiguer *in vivo* pour démontrer une potentielle causalité.

IV. Immunomodulations induites par les souches et infection chroniques par Sa

Les co-infections vont modifier l'environnement de Pa et son adaptation au cours du temps, en exerçant des pressions dans la lutte pour la niche écologique. Ces mécanismes d'adaptation vis-à-vis des pathogènes peuvent aussi impacter la façon dont Pa va interagir avec le système immunitaire et inversement. Il a notamment été décrit que les conditions d'inflammation dans l'environnement pulmonaire du patient pouvaient impacter la différenciation des CD, altérant leur capacité à se différencier en CD de type 1, pro Th1²⁵⁴. De la même façon Sa peut impacter directement le système immunitaire par la production de toxines telles que la γ -hémolysine, entraînant une toxicité directe vis-à-vis des PNN²⁵⁵⁻²⁵⁸. Ceci peut conférer un avantage à Pa, facilitant son propre échappement vis-à-vis de l'immunité du patient. Enfin, il a également été décrit que Pa pouvait manipuler l'immunité afin de lutter contre Sa, en induisant la production de sPLA2, dont l'effet bactéricide est plus marqué sur les bactéries GP, par injection d'ExoS par le SST3 dans le cytoplasme de cellules épithéliales pulmonaires²⁵⁹.

Nous avons ainsi évalué s'il y avait un lien entre les co-infections par Sa et un phénotype de modulation de la CD induit par l'exométabolome des souches cliniques de Pa. Une corrélation forte entre la colonisation par Sa et l'infection du patient par des souches « immunostimulantes » a été mise en évidence. A l'inverse, les souches « immunosuppressives » sont retrouvées chez des patients sans co-infections (Fisher exact, p-value = 0.01). Ce résultat est également soutenu par un test de compétition conduit sur 8 souches de la banque avec le Centre International de Recherche en Infectiologie de Lyon qui s'intéresse à l'interaction entre Pa et Sa. Ce test de compétition a été effectué par étalement sur gélose. Si un halo d'inhibition de la croissance de Sa apparaît autour du spot de Pa, il y a compétition entre les souches, sinon il y a co-existence²⁶⁰. Il a été montré que les 4 souches de Pa « immunostimulantes » co-existaient avec Sa alors que sur les 4 souches immunosuppressives évaluées 3 étaient en compétition vis-à-vis de Sa (tableau XI). Il est intéressant de noter que la dernière souche « immunosuppressive » qui co-existe avec Sa est située au centre des clusters immunostimulant et immunosuppresseur dans l'ACP. Cette analyse étant effectuée sur une gélose soutient l'hypothèse que cette interaction puisse être médiée par les métabolites produits par Pa qui diffuseraient alors dans la gélose et seraient responsables de cette inhibition de croissance. Ces résultats soulignent également une adaptation spécifique de Pa capable d'éliminer les co-infections et de lutter contre le système immunitaire, pouvant être à l'origine de l'altération de la fonction respiratoire des patients.

	Co-existence	Compétition	p-value
Souches immunosuppressives	1	3	0.01
Souches immunostimulantes	4	0	

Tableau XI : Résultats obtenus lors de tests de compétition entre les souches de Pa et Sa.

V. Validation des propriétés immunomodulatrices des souches *in vivo*

Afin de confirmer les propriétés immunomodulatrices des souches cliniques mise en évidence *in vitro* et d'évaluer la polarisation induite sur les LT au contact de la bactérie, nous avons conduit un challenge infectieux *in vivo*. Au cours de ce challenge réalisé sur un modèle murin, nous avons administré par voie intranasale 3 souches représentatives des 3 clusters observés précédemment (Fig 58). Concernant la sélection des souches, nous avons utilisé les mêmes isolats qu'au cours des manips *in vitro* : la souche « Immunostimulante PD-L2^{High} », « Immunostimulante PD-L2^{High} », et « Immunosuppressive ». Afin d'évaluer la réponse immunitaire développée au cours de l'infection, nous avons réalisé l'infection sur le modèle d'un prime / boost puis une dernière inoculation des souches la veille de la collecte des poumons, afin de permettre le recrutement *in situ* d'un grand nombre de cellules immunitaires et notamment des LT polarisés.

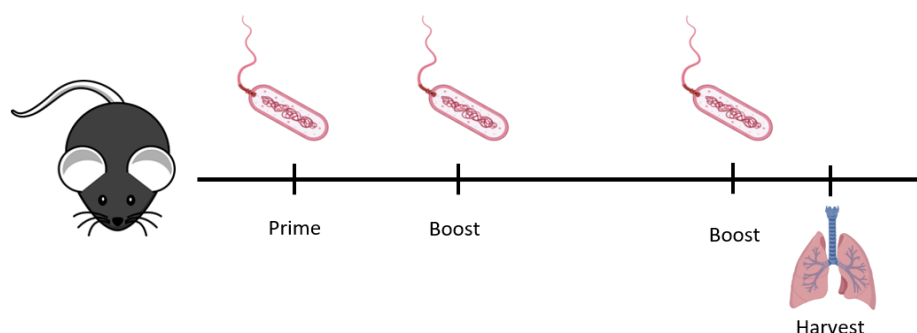


Figure 58 - Représentation du challenge infectieux réalisé avec les souches aux différentes propriétés immunomodulatrices : immunostimulantes PD-L2^{high} et PD-L2^{Low} et immunosuppressive. L'administration des souches est réalisée par voie intranasale selon un schéma d'un prime et deux boosts avant collecte des poumons.

1. Matériel et Méthode

L'infection par les souches a été réalisée selon un modèle infectieux déjà utilisé au laboratoire basé sur l'administration de la souche CHA et adapté pour l'évaluation de la réponse immunitaire. Les souches ont été cultivées en milieu SCFM jusqu'à une DO de 1 pour être en phase de croissance exponentielle. Les souris ont été infectées par 8×10^5 CFU dans 30 μ l inoculées par voie intranasale, sous anesthésie. Des étalements sur géloses LB ont été réalisés afin de s'assurer de la quantité de bactéries administrées. Pour l'administration intra nasale, la souris est sédaturée par de l'isoflurane puis elle est maintenue sur le dos, la tête inclinée en arrière. Le volume contenant les bactéries est déposé sur les narines à l'aide d'une pipette puis il est inhalé au cours des inspirations profondes déclenchées par la sédation. Cette manœuvre a été répétée 3 fois, lors du prime et des deux boosts. La collecte des poumons a été réalisée 12h après le deuxième boost. Pour cette étape la souris est euthanasiée par dislocation cervicale. Après prélèvement, les poumons sont placés en milieu de culture RPMI stérile. Les différents lobes sont séparés, puis dilacérés avant

d'être incubés pendant 30min à 37° en plaque 6 puits dans 4ml de milieu de digestion constitué de RPMI et de Libérase (concentration finale 25µg/ml, Sigma). La suspension cellulaire est ensuite filtrée à l'aide d'un cell strainer et séparée dans différents tubes FACS pour effectuer les immunomarquages des différentes populations de cellules immunitaires : les CD, les LT et les monocytes et les PNN (tableau XII). Comme présenté auparavant, une étape de stimulation PMA/Iono des LT a été réalisée pour analyser l'expression des cytokines ou de facteurs de transcription intra-cellulaire.

Tableau XII : Panel d'anticorps utilisé en CMF pour l'analyse des cellules immunitaires impliquées dans la réponse à l'infection contre Pa.

	Monocytes-PNN	CD	LT
APC-C7	CD45		
FITC	CD11c		CD3
PE	CD40		TFNa
PC7	CD80	CD86	CD25
PerCP-Cy5.5	CD11b	CMHII	CD4
APC	Ly6G	PDL1	/
APC-R700	/		IL-2
Alexafluor 647	/		FoxP3
BV421	Ly6C	PDL2	IL-17
BV605	/		IL-4
BV711	/		IL-10
BV786	/		IFNg
V500	LD		

Par rapport à ce que nous avons observé auparavant, l'infection des souches a été réalisée au cours de la phase exponentielle de croissance. L'expression variable des marqueurs membranaires de la CD, par rapport à la condition LPS seul obtenue par le test immunologique *in vitro* en phase de croissance exponentielle est donc représentée sur la figure 59 pour chacune des souches sélectionnées afin de pouvoir comparer ces résultats à ceux obtenues *in vivo*. Les immunomodulations observées sont similaires à celles décrites auparavant, à l'exception de l'expression du PD-L2 pour laquelle nous n'observons pas de différence statistiquement significative entre les souches pourtant identifiées « PD-L2^{high} » et « PD-L2^{low} ». Pour rappel, cette différence n'apparaît qu'au cours de la phase de croissance stationnaire.

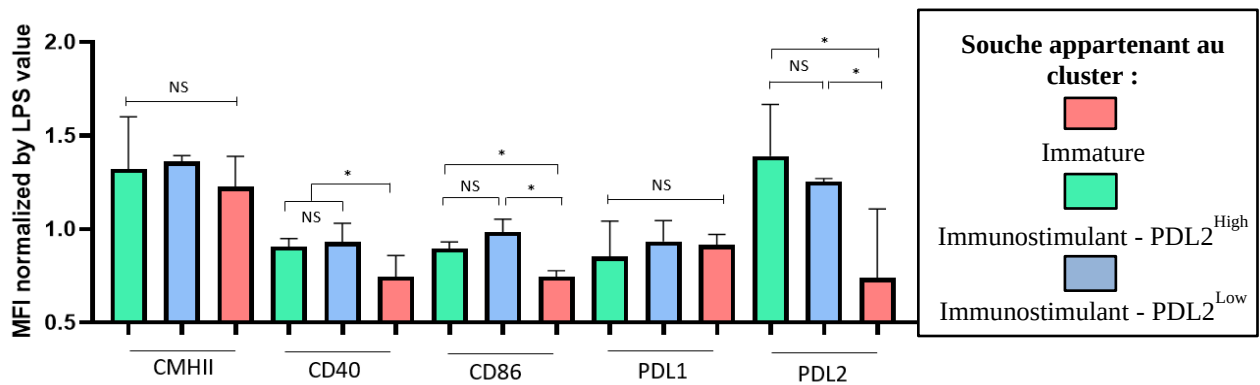


Figure 59 - Valeur de MFI en phase exponentielle des différents marqueurs membranaires obtenue par le test immunologique *in vitro*, en fonction de leur appartenance aux clusters immunologiques.

2. Immunité développée *in vivo*, contre les souches aux propriétés immunomodulatrices distinctes.

➤ 2.1. Infiltration et maturation des monocytes et des PNN intrapulmonaire en présence des souches aux propriétés immunomodulatrices distinctes

Dans la suspension cellulaire obtenue, les leucocytes sont ciblés par le CD45. Les monocytes et les PNN sont ensuite mis en évidence par un marquage CD11b+CD11c-. Le Ly6C permet de cibler les monocytes, tandis que le Ly6G permet de cibler les granulocytes. Sur ces cellules nous avons analysé l'expression du CD40 et du CD80. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence qu'il n'y avait pas de différence dans l'infiltration en Monocytes ou en PNN entre les différentes souches (Figure 60). L'expression du CD40 et du CD80 à leur surface ne présentait pas non plus de différence (résultats non présentés).

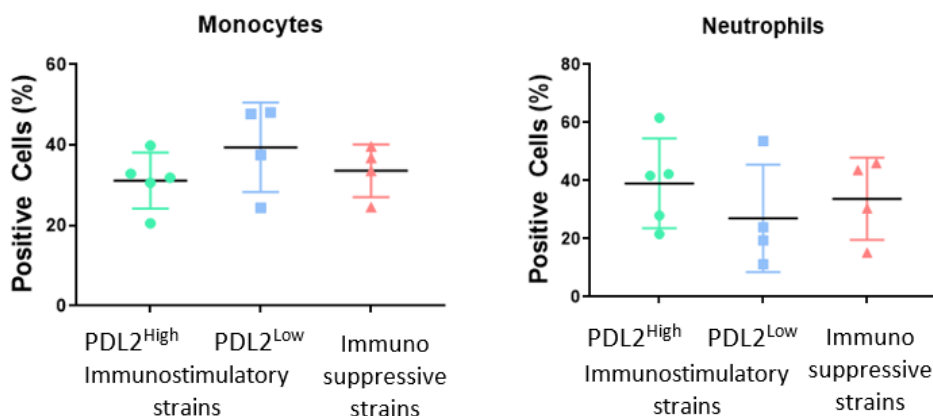


Figure 60 : Infiltration pulmonaire en monocytes et PNN en fonction des 3 types de souches utilisées pour le challenge infectieux. Aucune différence significative n'a été observée

➤ 2.2. Evaluation de la modulation de l'activation et de la maturation des CD

L'activation et la maturation des CD intra pulmonaire ont également été évaluées. Nous avons pu montrer par l'expression du CMHII, que les différents types de souches activaient les CD,

comme cela avait déjà été mis en évidence *in vitro* (Figure 61). Cependant, des différences sur la maturation des CD entre les souches « immunostimulantes » et la souche « immunosuppressive » ont pu être observées. Une expression supérieure de CD40 et de CD80 par les souches immunostimulantes a été mise en évidence (Figure 61). Cependant, une augmentation du PD-L1 par les souches « immunostimulantes » est également observable, ceci peut être expliqué par le fait qu'il y a également une expression légèrement plus importante du CMHII par les CD, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative, et que l'expression du PD-L1 augmente avec l'activation de la CD. Ces résultats confirment ceux observés *in vitro*, à l'exception de la différence marquée observée sur le PD-L2, que nous ne retrouvons pas dans cette analyse. Les souches étant administrées en phase exponentielle de croissance, celles-ci peuvent ne pas produire les métabolites à l'origine des différences observées pour le PD-L2.

Cette expérience a été dupliquée concernant les souches immunostimulantes PD-L2^{high} et immunosuppressive qui présentaient les résultats les plus extrêmes et nous ont permis de confirmer les résultats obtenus sur les CD *in vivo*, à l'exception de l'infiltration en CD intra pulmonaires. Nous avons pu observer une infiltration en CD significativement plus importante pour la souche immunostimulante (test de Mann Whitney, p-value = 0.04).

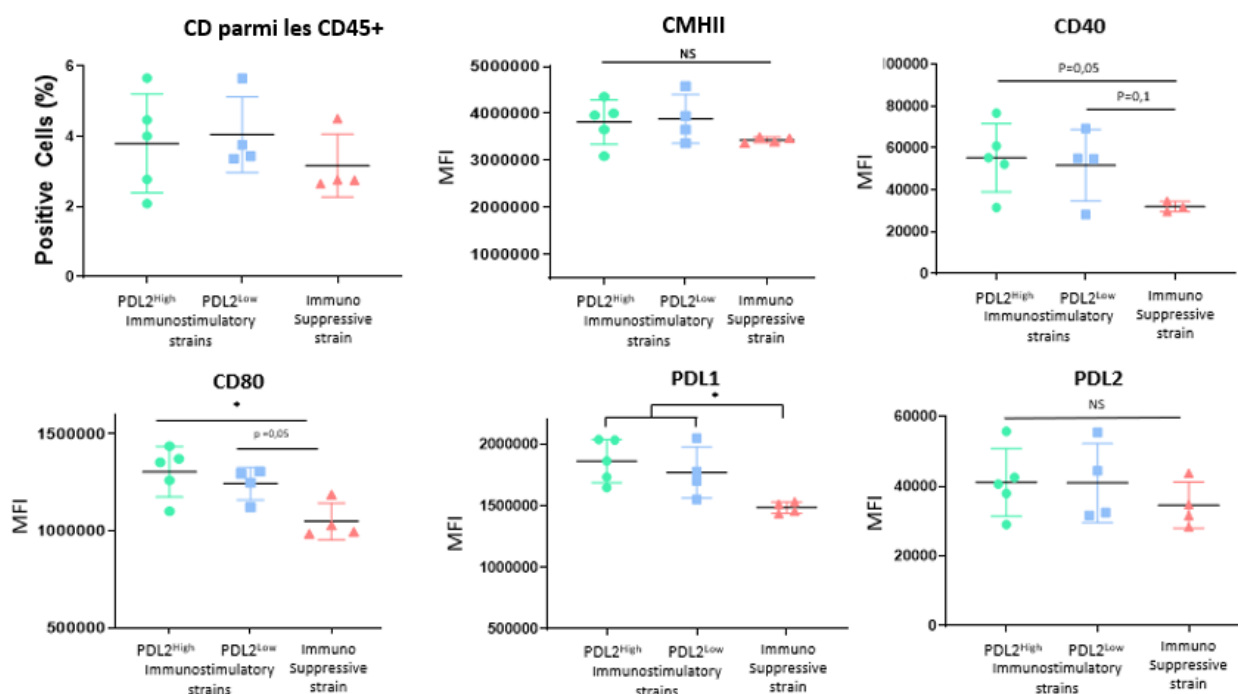


Figure 61 - Activation et maturation des CD en fonction des 3 types de souches. Aucune différence n'a été observée concernant l'infiltration en CD au niveau pulmonaire ou dans l'activation des CD analysée par l'expression du CMHII. Cependant, une expression plus importante du CD40, CD80 mais également du PD-L1 a été observée lors de l'infection par les souches immunostimulantes PD-L2^{High} et PD-L2^{Low} par rapport à la souche suppressive. Aucune différence n'a été observée par rapport à l'expression du PD-L2.

3. Evaluation de la polarisation des LT au cours du challenge infectieux

Enfin nous avons réalisé l'analyse de la polarisation des LT *in vivo*. Pour représenter les nombreuses populations évaluées, nous avons réalisé une représentation en heatmap (Figure 62A). Cette représentation nous permet d'identifier quelles sous populations de LT sont induites par chaque sous type de souches.

Nous voyons alors que la souche immunosuppressive induit une forte proportion de LT régulateur d'IL-10. Nous observons également une augmentation des T IL-2+, qui au-delà de l'activation immune, peuvent profiter préférentiellement aux Tregs qui expriment constitutivement le récepteur de haute affinité à l'IL2 : CD25 (IL2R α). A l'inverse, les souches immunostimulantes induisent une forte proportion de lymphocytes T effecteurs, notamment pour la souche « PD-L2 high » et des résultats intermédiaires pour la souche « PD-L2 Low » (Figure 62 A). On observe également avec la souche immunostimulante « PD-L2 high » une expression plus marquée des Th1, des Th2 mais également de l'infiltration en LT CD8+. Un des sous-types de LT les plus fortement exprimés lors de l'infection par les souches immunostimulantes sont les lymphocytes Th17, sous type lymphocytaire majeur dans la réponse aux infections pulmonaires (cf intro, Figure 62B). Ces résultats sont en lien avec le phénotype des CD, que ce soit sur la lignée cellulaire ou les BMDC, et la polarisation T *in vitro*.

Cette expérience a été dupliquée concernant la souche immunostimulante PD-L2^{high}, présentant les résultats les plus extrêmes entre les deux souches immunostimulantes, et la souche immunosuppressive. Nous avons également ajouté un groupe contrôle, pour connaître l'état immunitaire basal du poumon. La polarisation des LT au cours de l'infection était similaire à celle que nous avons pu observer précédemment (Fig 63 A et B). Par rapport à la condition contrôle, non présente dans la première expérience, nous observons que le phénotype Th1 n'est pas prédominant, ceci correspond à ce que nous avons observé lors de l'évaluation de la polarisation des LT *in vitro*, qui était en faveur d'une polarisation pro Th2 et surtout Th17. Ces deux sous types de LT ont également été mis en évidence par d'autres équipes comme cela a été montré dans l'introduction et notamment par Tiringier K. et son équipe dans l'infection à Pa de patients atteints de mucoviscidose, par dosage des cytokines dans le LBA²⁶¹.

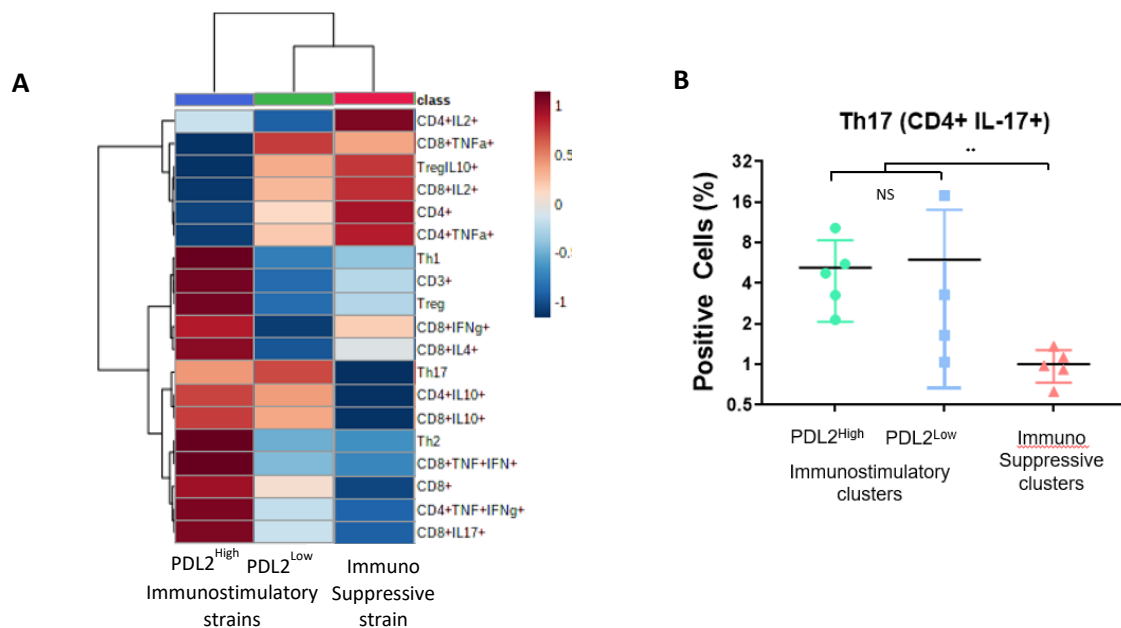


Figure 62 - Polarisation des LT induite au cours du challenge infectieux en fonction des souches aux propriétés immunomodulatrices différentes. Les différentes populations lymphocytaires T développées au cours de l'infection vis-à-vis des souches sont représentée sur la heatmap, montrant une forte proportion de LT effecteurs lors de l'infection par la souche immunostimulante PD-L2^{high} et des résultats intermédiaires pour la souche immunostimulante PD-L2^{Low} entre les deux autres types de souches (A). Une des sous populations lymphocytaires majeures sont les Th17, dont la proportion est beaucoup moins marquée lors de l'infection par la souche suppressive (B).

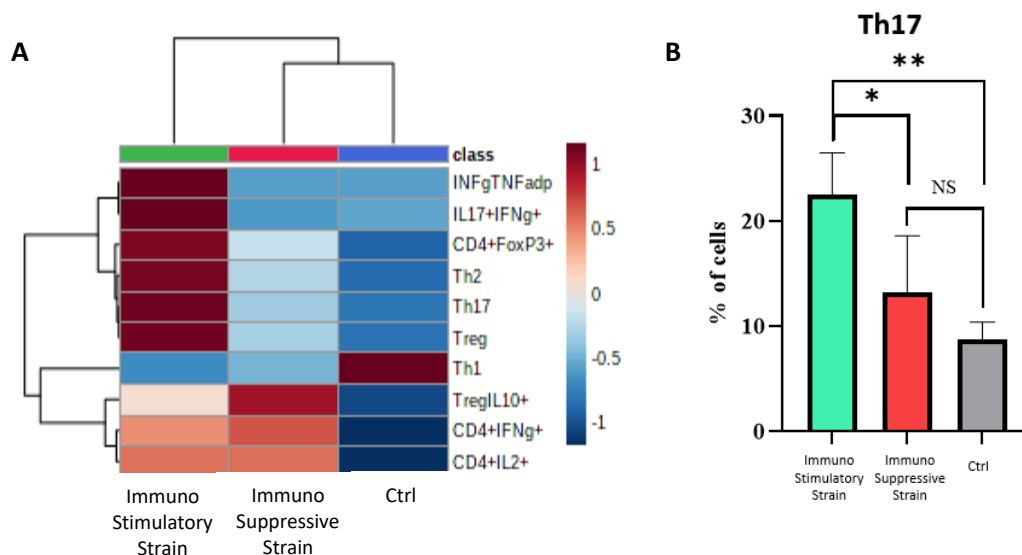


Figure 63 - Polarisation des LT obtenue lors de la duplication du challenge infectieux avec les souches immunostimulante PD-L2^{high} et immunosuppressive, par rapport au groupe contrôle (A) et présentation des résultats obtenus pour le sous type Th17 (B). Les résultats sont similaires à ceux de la première expérimentation et souligne une proportion plus marquée de Th1 à l'état basal dans le poumon.

Les résultats obtenus au cours de l'expérimentation *in vivo* sont d'autant plus importants qu'ils permettent de valider les propriétés immunomodulatrices de l'exométabolome des souches sur la polarisation des LT, en prenant en compte cette fois l'ensemble des facteurs de virulence de la bactérie. Il est intéressant de noter que les souches présentaient à la base une virulence similaire, puisque la souche immunostimulante PD-L2^{High} et la souche immunosuppressive appartiennent au même cluster de virulence identifié dans la partie I.

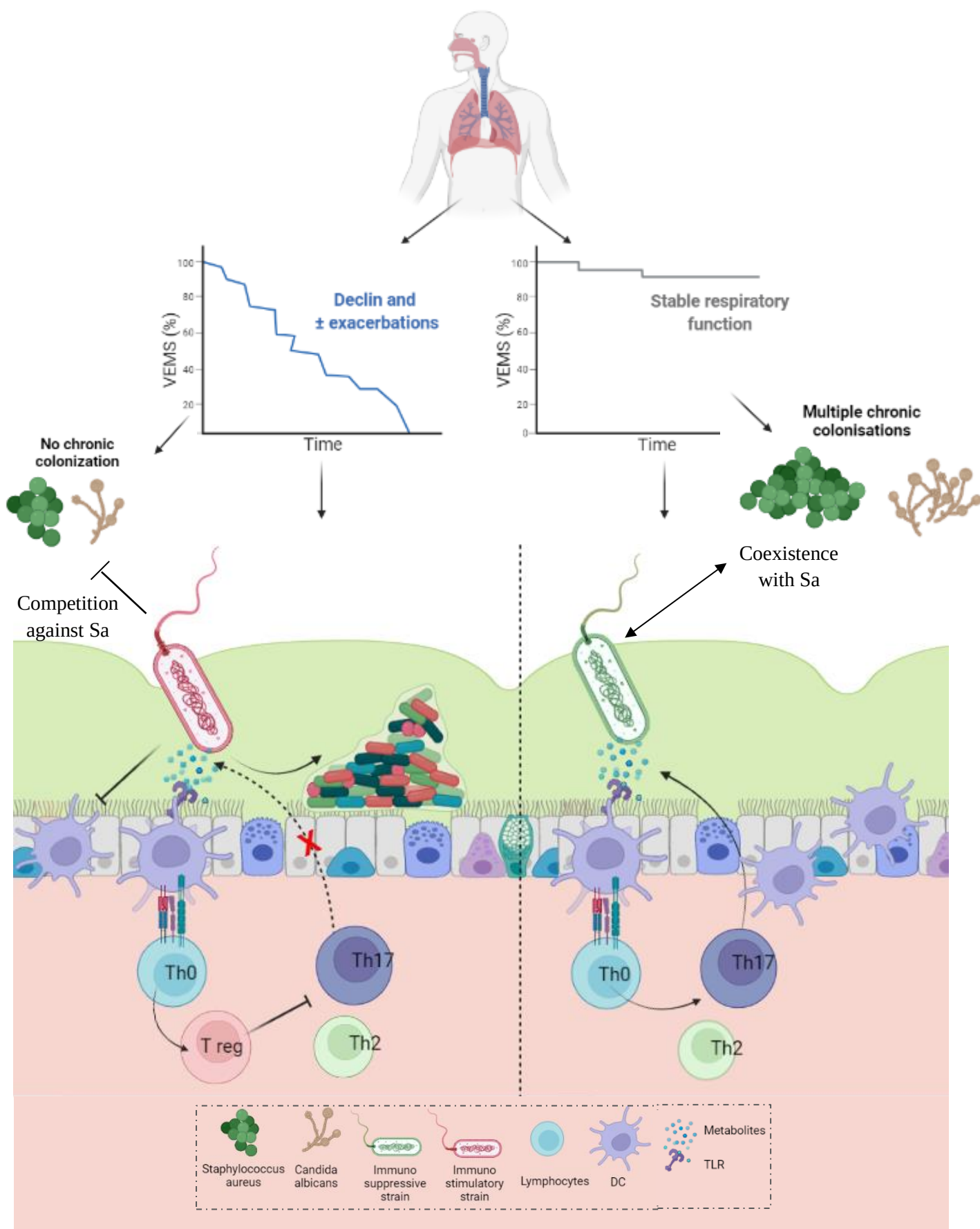
Ces résultats nous permettent de mettre en évidence que les immunomodulations, médiées par les métabolites, identifiées sur les CD par le test immunologique *in vitro* étaient corrélées à celles obtenues sur la polarisation des LT *in vitro* et *in vivo*. Ceci valide l'utilisation de ce test pour l'obtention de résultats robustes pour le screening des propriétés immunomodulatrices de métabolites d'intérêt. Il constitue également une alternative rapide et simple d'utilisation pour cette caractérisation, notamment en comparaison avec les expérimentations *in vivo*.

Nous avons utilisé différentes approches pour étudier les capacités immunomodulatrices de souches cliniques de Pa, médiées par l'exométabolome :

- Dans une 1^{ère} approche, nous avons développé un test immunologique *in vitro* consistant en l'évaluation de la **modulation de l'activation et de la maturation de CD** (les DC2.4) sous activation LPS en présence de métabolites purifiés ou de SN de culture. Les mises au point ont été effectuées sur métabolites immunomodulateurs purifiés ou sur l'évaluation de l'exométabolome de souche de Pa WT et bio-ingénierée sur une voie métabolique connue pour ses propriétés immunomodulatrices. Nous avons ensuite caractérisé l'immunomodulation induite par l'exométabolome de l'ensemble des souches cliniques de la banque, collectées au cours de la phase de croissance exponentielle et stationnaire. Ceci nous a permis d'identifier 3 types d'immunomodulations, des souches **immunosuppressives**, induisant une diminution de l'ensemble des marqueurs membranaires de la CD, et des souches **immunostimulantes**, induisant une augmentation de l'expression des marqueurs et **se différenciant par une expression variable du PD-L2**, un marqueur de co-inhibition dont l'implication au cours des infections est mal définie.
- Ces résultats observés sur une lignée, ont été validés sur des BMDC et sur des CD pulmonaires *in vivo* au cours d'un challenge infectieux.
- Nous avons également caractérisé l'impact de l'exométabolome des souches sur des **macrophages**, des BMDM, afin d'identifier si cette modulation était spécifique des CD ou impactait différents types cellulaires. De façon intéressante, nous avons pu mettre en évidence que contrairement à ce que nous observions sur les CD, la polarisation des macrophages vers un phénotype plutôt M1 ou M2 n'était pas modifié.
- Nous avons ensuite évalué la **polarisation de LT** *in vitro*, induite par les CD matures et activées, dans un modèle de co-culture allogénique de CD, des BMDC et de LT CD4⁺ naïfs. Ceci nous a permis de confirmer les propriétés immunomodulatrices des souches que nous avons pu observer sur les CD, en mettant en évidence que la souche immunosuppressive, induisait une proportion plus importante de LT régulateurs producteurs d'IL-10. A l'inverse, nous avons pu montrer que la souche immunostimulante PD-L2^{Low} induisait une polarisation des LT vers un phénotype Th17. Enfin, l'exométabolome de l'ensemble des souches entraînait une polarisation de type Th2 plutôt que Th1. Ainsi le phénotype de la CD prédit la polarisation T *in vitro*

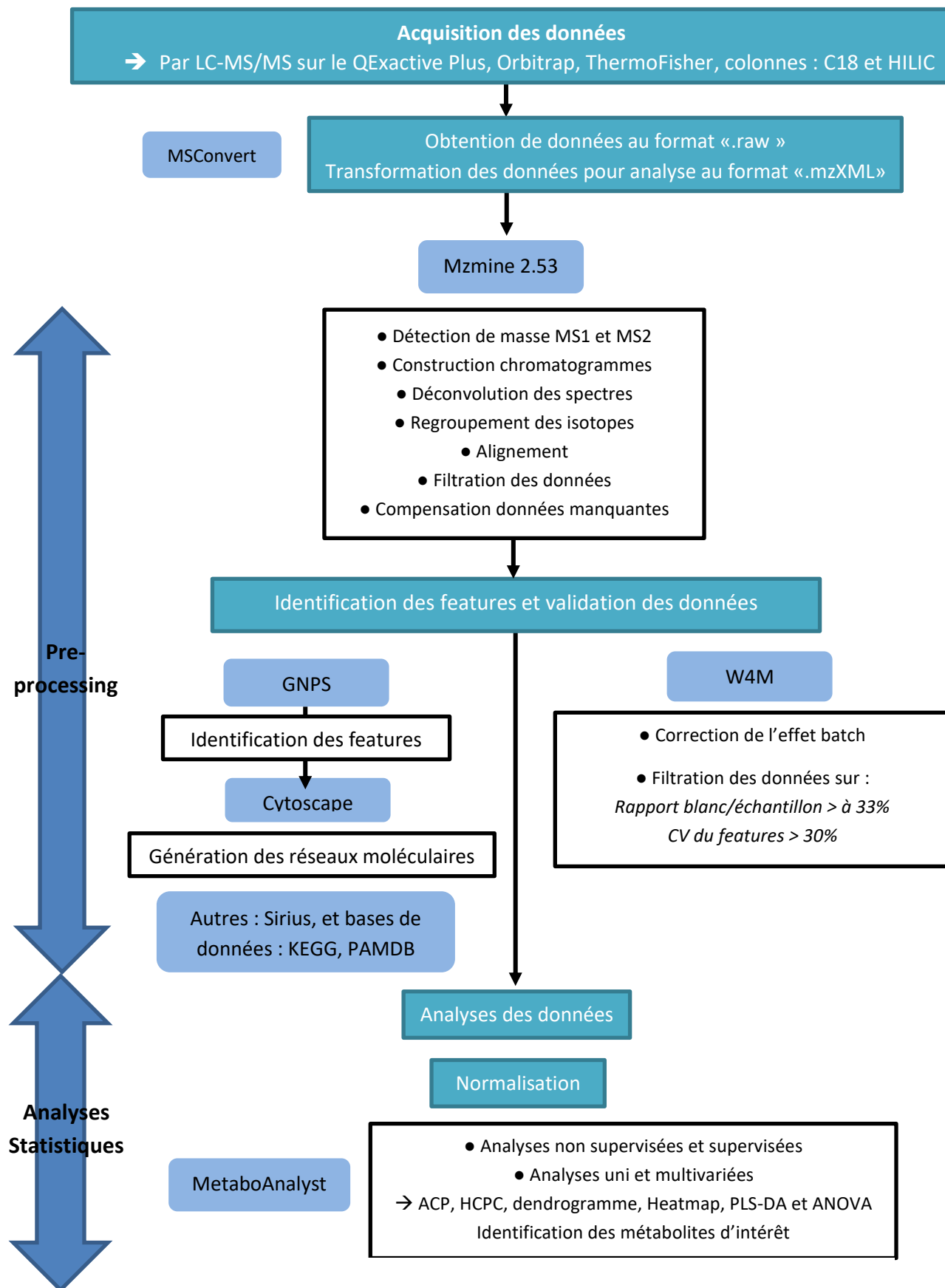
- Enfin, nous avons caractérisé les propriétés immunomodulatrices des souches de façon globale, non médiée uniquement par l'exométabolome, en conduisant un **challenge infectieux par administration des souches cliniques de Pa par voie intranasale**. Le schéma de ce challenge était d'un prime et deux boosts avant de collecter les poumons pour évaluer la réponse immunitaire intra pulmonaire. Nous avons ainsi pu observer qu'il n'y avait pas de différence sur l'infiltration des macrophages ou des PNN, ni sur la modulation de leur activation. Nous avons pu mettre en évidence que **les immunomodulations observées *in vitro* étaient confirmées *in vivo***. En effet, nous avons pu montrer que si l'activation des CD induite par les différents types de souches ne variait pas, l'expression du CD40, du CD80 et du PD-L1 était diminuée par la souche immunosuppressive par rapport aux souches immunostimulantes. Nous ne retrouvons pas de différence concernant l'expression du PD-L2, il serait intéressant de voir si l'administration de souches en début de phase stationnaire ou sur un modèle d'infection chronique permettrait de retrouver une augmentation de l'expression de ce marqueur par les souches du cluster correspondant. Concernant la polarisation des LT, nous avons également pu observer que les souches immunostimulantes induisaient une polarisation de type Th17 contrairement à la souche immunosuppressive qui induisait une polarisation des LT vers un phénotype T régulateur. Toutes les souches induisaient également une polarisation de type Th2 plutôt que Th1. **Ces résultats permettent de confirmer les propriétés immunomodulatrices des souches médiées par l'exométabolome, dans un challenge infectieux *in vivo*.**

Ces différentes caractérisations nous ont permis de mettre en évidence que les souches cliniques de Pa issues de patients infectés chroniquement possédaient des capacités immunomodulatrices différentes et que l'exométabolome jouait un rôle majeur dans cette immunomodulation puisque les résultats observés *in vitro* sont validés *in vivo* dans un modèle infectieux prenant en compte l'ensemble des facteurs de virulence de la souche. Il est à noter que les souches immunostimulantes sont capables de co-exister avec Sa alors que les souches immunosuppressives présentent un mécanisme de compétition vis-à-vis de Sa qui pourrait être médié par l'exométabolome. De façon intéressante, nous avons également pu mettre en évidence que l'évolution de la fonction respiratoire des patients était corrélée au type de souches les infectant, c'est-à-dire que les patients présentant un déclin des fonctions respiratoires étaient infectés par des souches immunosuppressives. Cette stratégie d'adaptation pourrait leur permettre d'échapper à l'immunité et d'évoluer chez le patient, entraînant un déclin des fonctions respiratoires et augmentant la fréquence des exacerbations.



Chapitre III : Caractérisation de l'exométabolome des souches par métabolomique

La caractérisation métabolomique a été réalisée selon le workflow suivant (fig. 64):



Dans ce chapitre, nous décrivons comment nous avons caractérisé l'exométabolome de l'ensemble des souches de la banque, collecté en phase de croissance exponentielle et stationnaire. L'ensemble des étapes est représenté sur la figure 64. Pour cela, nous avons développé une méthode d'analyse de l'exométabolome bactérien par métabolomique non ciblée en LC-MS/MS. Les analyses se décomposent en deux étapes, une étape de pré-processing des données et une étape d'analyse statistique permettant de faire ressortir l'information biologique. Un des obstacles aux analyses par métabolomique est la complexité de la génération et de la gestion des données massives. L'étape de pré-processing des données consiste à passer des fichiers de données brutes à une liste de features caractérisés par leur rapport m/z, leur temps de rétention sur la colonne et l'aire sous courbe de chaque pic. Pour cette étape, nous avons mis au point un workflow d'analyses avec pour objectif de diminuer l'effet « boîte noire » de ce type d'approche. Le pré-processing se décompose en différentes étapes qui sont présentées sur la figure 64. Nous avons ensuite réalisé différents contrôles qualité des données afin d'éliminer les features non informatifs. Pour étudier l'exométabolome des souches, nous avons dû nous affranchir des métabolites issus du milieu de culture SCFM. Une caractérisation de ce milieu chimiquement défini a donc été réalisée selon la même méthode. Enfin, nous avons analysé différentes techniques de normalisation des données avant de passer aux analyses statistiques. Les analyses statistiques utilisées en métabolomique s'organisent, tel que présenté sur figure 65. Une autre analyse peut être réalisée, il s'agit de la méthode HCPC utilisée au cours du chapitre II, qui permet d'associer les analyses ACP et CAH.

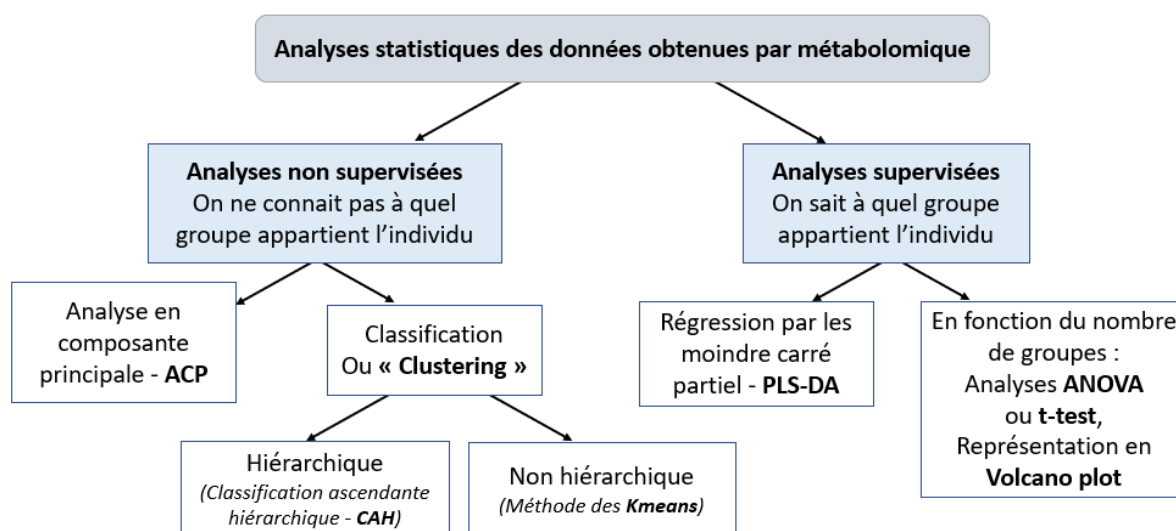


Figure 65 - Représentation des différents types d'analyses statistiques multivariées appliquées notamment aux analyses de métabolomique.

Dans la suite de ce chapitre sont présentées les techniques et méthodes utilisées pour l'acquisition des échantillons puis pour le pré-processing des données pour obtenir l'ensemble des features caractéristiques des échantillons et enfin les analyses statistiques permettant de mettre en évidence les métabolites d'intérêts.

I. Technique des analyses de métabolomique par LC-MS/MS

La caractérisation métabolomique a été effectuée par LC-MS/MS sur un système Vanquish couplé au QExactive™ plus doté de la technologie Orbitrap™ de Thermo Fisher. Deux types de colonnes de chromatographie ont été utilisés afin de mettre en évidence un maximum de composés, les colonnes C18 et HILIC. Pour avoir une couverture complète de la détection des métabolites, lors de l'analyse avec les colonnes C18, nous avons utilisé un mode d'ionisation positif, nous avons voulu à l'inverse avec les colonnes HILIC utiliser un mode d'ionisation négatif. Cependant, le mode négatif ne nous a pas permis de mettre en évidence beaucoup de features, ni d'identifications pertinentes. Nous avons donc opté pour un seul type d'ionisation, le mode positif mais avec une approche par 2 colonnes différentes.

1. Acquisition sur colonne C18

Pour cette acquisition, la reconstitution des échantillons stockés sous forme d'extrait sec a été effectuée dans 100µl de Tampon A correspondant au mélange H₂O, 0,1% Acide Formique (FA) auquel est rajouté 1% d'Acétonitrile (ACN). Le tampon B correspond à de l'ACN 0,1% FA. Afin d'optimiser notre technique d'analyse, une comparaison de différentes colonnes et méthodes d'analyse publiées dans la littérature a été réalisée, les résultats sont présentés dans le tableau XIII. Nous avons repris en premier lieu la technique d'analyse de l'endométabolome des souches de la banque effectuée par le CEA Paris Saclay et laboratoire du LEMM (Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments). Nous avons également sélectionné d'autres études s'intéressant plus particulièrement à l'exométabolome de bactéries pour adapter notre méthode et le type de colonne à cette nouvelle matrice^{262,263}. Les colonnes utilisées dans les études ayant des diamètres plus restreints, nous avons sélectionné la colonne Luna Omega 1,6µm Polar C18, 150*2,1mm de Phenomenex®. Les différents paramètres d'analyse ont été combinés et validés pour sélectionner les éléments suivants : le volume d'injection est de 5µl, le débit d'élution est de 400µl/min dans une colonne chauffée à 30°C avec un gradient d'élution de phases mobiles A et B. La phase mobile A était constituée de H₂O 0,1% FA, et la phase mobile B d'ACN 0,1% FA. L'élution a été réalisée avec 1% de phase mobile B pendant 2 min, suivie d'un gradient linéaire de 1% à 75% de phase mobile B sur 12min et d'un rinçage à 100 % de B pendant 6 min, enfin une phase d'équilibration de 5 min à 1% de B a été réalisée. Au niveau du spectromètre de masse, l'analyse a été faite en source d'ionisation positive, le voltage capillaire est de 4 kV et la température de 280°C. La détection a été effectuée sur l'intervalle de 85 à 1275m/z avec une résolution de 17 500.

Tableau XIII : Comparaison de différentes techniques d'analyse sur colonne C18.

		Moyne O. et al., 2021 ³³	Demissie Z.A. et al., 2020 ²⁶³	Habadi N. et al., 2020 ²⁶²
Type de colonne		Hypersil GOLD 1,9µm *150mm*2,1mm Thermo Fisher Scientific	Kinetex 1,7µm 50mm*2.1mm Phenomenex	1,7 µm 100mm*2.1mm Waters
Flux d'élution		500µl/min	350µl/min	400µl/min
Phase A		0,1% FA (H2O)	0,1% FA (H2O)	20 mM formiate ammonium + 0,1% FA (HCOOH) (H2O)
Phase B		0,1% FA (ACN)	0,1% FA (ACN)	0,1% FA (ACN)
Phase isocratique	ACN	5%	5%	95%
	Temps	2 min	4,5 min	1,5min
Gradient linéaire	ACN	100%	95%	45%
	Temps	NA	8 min	17-19min
Rinçage	ACN	100%	5%	NA
	Temps	11 min	9 min	NA
Equilibration	ACN	5%	5%	Conditions initiales
	Temps	4,5 min	10 min	5min
Paramétrage	Voltage capillaire	5 kV	35 V	2 kV
	T° capillaire	280°C	320°C	NA
	Plage	75-1000 m/z	100-2000 m/z	50-1200 m/z
	Résolution	50 000 à 200 m/z	NA	NA
	Volume	10µl	NA	2µl
	T° colonne	NA	NA	NA
	Temps acquisition	NA	NA	500ms

2. Acquisition sur colonne HILIC

L'analyse sur colonne HILIC est plus complexe que sur colonne C18. Les résultats obtenus sont souvent moins reproductibles que sur colonne C18. Le temps d'équilibration de la colonne avant réalisation des analyses est plus long ainsi que le temps de rééquilibration entre chaque échantillon.

Nous avons repris les échantillons dans un tampon de reconstitution contenant 60% d'ACN et 40% de mélange H₂O (30%) et acétate d'ammonium (10%). La colonne de chromatographie sélectionnée est la colonne Luna HILIC 3µm 200Å, 2 X 150 mm (Phenomenex®). La phase mobile A est composée d'H₂O à 40%, 50% ACN, et 10% d'acétate d'ammonium 5mM et la phase mobile B est composée d'ACN 90%, 10% acétate d'ammonium 5mM, pH 5,8. Les métabolites analysés ont plus tendance à accrocher sur ces colonnes, donnant des pics plus larges qu'en C18. Il est décrit qu'une concentration insuffisante en tampon peut entraîner une augmentation des interactions secondaires et un étalement des pics. Cependant, l'augmentation de la concentration en tampon, en l'occurrence dans notre méthode, en acétate d'ammonium, est à l'origine de précipitation et ne permet pas la réalisation de l'analyse. Afin d'améliorer l'aspect du chromatogramme et donc la détection des features, nous avons effectué une comparaison de plusieurs gradients d'élution, présentés dans le tableau XIV. Deux des chromatogrammes obtenus sont présentés sur la Figure 66. Les paramètres finalement retenus sont les suivants : le volume d'injection est de 5µl, le flux

d'élution était de 200µl/min dans une colonne chauffée à 30°C avec comme gradient d'élution de phases mobiles A et B : 100% de phase mobile B pendant 2,5min, suivie d'un gradient linéaire de 100% à 0% de phase mobile B sur 8min et d'un rinçage à 100 % de A pendant 2,5min, enfin une phase d'équilibration de 23,5min à 100% de B a été réalisée. Au niveau du spectromètre de masse, l'analyse a été faite en source d'ionisation positive également. La détection a été effectuée sur l'intervalle de 85 à 1275m/z avec une résolution de 17 500.

		1	2	3	4	5
Flux d'élution		200µl/min				
Phase A		H2O - ACN - Acétate d'ammonium 10mM (pH 9) et 5mM (pH 5.8)				
Phase B		ACN ou ACN - Acétate d'ammonium 5mM				
Phase isocratique	ACN	90%	90%	90%	90%	90%
	Durée	0-1.5 min	0-1.5 min	0-1.5 min	0-1.5 min	0-1.5 min
Gradient	ACN	Linéaire	Multipente	Multipente	Linéaire	Multipente
		90-50%	(1) 90-68% (2) 68-50%	(1) 90-60% (2) 60-50%	90-50%	(1) 90-60% (2) 60-50%
	Durée	1.5-10 min	(1) 1.5-6 min (2) 6-11 min	(1) 1.5-5 min (2) 5-10 min	1.5-15 min	(1) 1.5-7.5 min (2) 7.5-12.5 min
Rinçage	ACN	50%				
	Durée	10-12.5 min	11-13.5 min	10-12.5 min	15-17.5 min	12.5-17.5 min
Equilibration	ACN	90%				
	Durée	12.5-36 min	13.5-37 min	12.5-37 min	17.5-41 min	17.5-42 min

Tableau XIV : Comparaison de différentes méthodes d'analyse sur colonne HILIC.

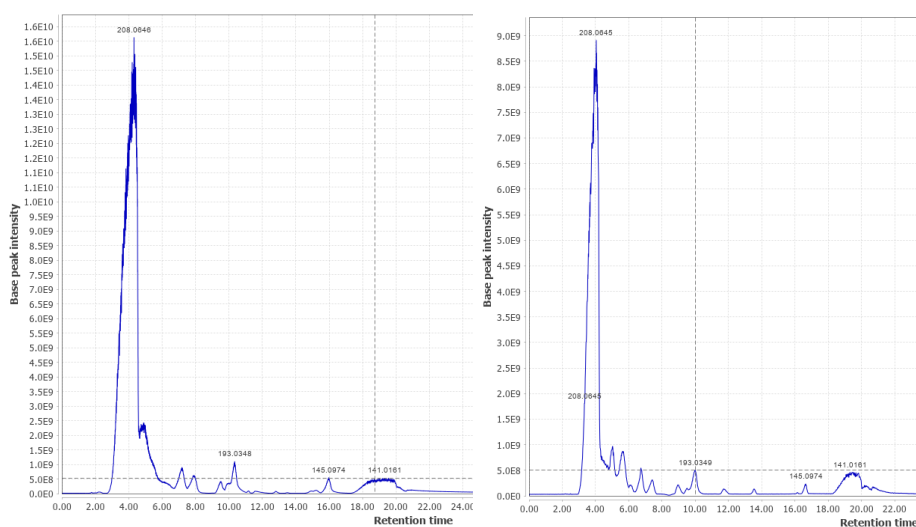


Figure 66 - Représentation des chromatogrammes obtenus après analyse sur colonne de chromatographie HILIC, avant (A) et après (B) optimisation de la méthode d'acquisition, permettant d'obtenir une meilleure séparation des pics du chromatogramme.

3. Standards internes

Les standards internes (SI) permettent d'identifier un problème survenu au cours de l'acquisition ou de la partie pré-analytique, que ce soit au moment de la déprotéinisation ou de la reconstitution. Dans nos analyses, les standards internes ont été ajoutés lors de la l'étape de reconstitution de l'échantillon, directement dans le tampon ajouté à l'échantillon.

Pour les analyses en mode négatif, nous avons développé l'utilisation d'un nouveau standard interne : le Loflazépate d'éthyl, un apparenté aux benzodiazépines qui n'est actuellement plus utilisé en clinique. Pour valider ce standard nous avons cherché à identifier une molécule qui n'était pas présente dans nos échantillons, compatible avec notre colonne HILIC et l'ionisation en mode négatif et qui n'était pas co-éluee avec nos molécules d'intérêt. Nous avons donc fait une première évaluation de la molécule dans du tampon A à différentes concentrations, puis dans les échantillons selon les deux gradients d'élution que nous avons retenus au préalable. Les résultats présentés dans la figure 67, nous ont permis de valider les différents critères nécessaires à la sélection de notre standard pour l'analyse en colonne de chromatographie HILIC en mode négatif. Ce composé de masse molaire de 360,7 g.mol⁻¹ a été ajouté au tampon A à une concentration de 7µM, il présente un rapport m/z de 359,061 et un RT de 1,51min par notre méthode d'analyse. Ce contrôle vient donc compléter d'autres techniques de validation de la qualité de l'échantillon, à savoir l'évaluation de l'intensité ionique totale des échantillons, et la visualisation d'outliers en PCA. Pour le mode d'ionisation positif finalement utilisé, nous avons utilisé la Sulfaméthazine et l'Amitriptyline, deux médicaments utilisés chez l'homme, non présents dans nos échantillons qui étaient déjà validés pour l'utilisation en C18 en mode positif dans le laboratoire.

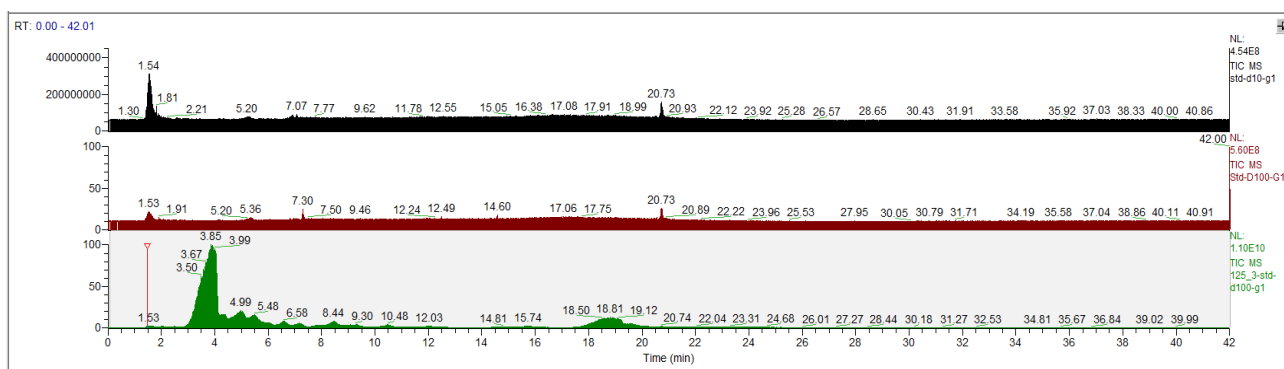


Figure 67 – Chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des standards internes en purifiés et dans un échantillon complexe. Sur les deux chromatogrammes du haut, le standard interne a été analysé sur colonne HILIC en tampon A à différentes concentrations, représentées par le pic visualisé à 1,5min. L'acquisition a ensuite été réalisée en plaçant le SI dans l'échantillon, donc dans l'exométabolome des souches cliniques (chromatogramme du bas), il est représenté par le curseur rouge sur la figure.

4. Traitement des données ou pré-processing

La métabolomique génère, comme toutes les techniques d'analyses « -omics », une quantité très importante de données qui font émerger de nouveaux défis sur la génération et l'exploitation de ces données. Les données ainsi obtenues sont représentées par des spectres, et présentées sous la forme de fichiers « raw ». Les fichiers « raw » sont convertis à l'aide du logiciel MsConvert en fichiers « mzXML », fichiers de stockage dédiés aux données de spectrométrie de masse. Un pré traitement des données est ensuite réalisé. Nous avons réalisé 2 pré-processing des données, , un par le logiciel MZmine (version 2.53)²⁶⁴ et un par une analyse R studio à l'aide du package XCMS²⁶⁵. Dans la suite de ce travail, ce sont les résultats des analyses effectuées sur colonnes C18 qui seront présentées, nous avons effectué le même pré-processing des données sur colonnes HILIC.

➤ 4.1. Pré-processing par le logiciel logiciel MZmine

Le workflow que nous avons utilisé et que nous détaillons par la suite a été mis au point avec l'aide du manuel MZmine. L'ensemble des étapes a été validé à l'aide des outils de visualisation fournis par le logiciel :

- Filtration des données sur le temps de rétention :

Cette étape permet d'éliminer la fin du spectre qui correspond au lavage et à l'équilibration de la colonne. Il entraîne un important bruit de fond ne présentant pas d'intérêt particulier lors de l'analyse. Nous avons donc sélectionné comme temps d'analyse tout ce qui était compris jusqu'à la 17^{ème} min pour éliminer le bruit de fond correspondant à la phase d'équilibration, à la fin du chromatogramme.

- Détection de la masse en MS1 et en MS2 :

Elle permet d'obtenir, à partir des scans contenus dans les données brutes, une liste de masses correspondant à des ions. L'automate QExactive™ de ThermoFisher est muni d'un Orbitrap™. L'acquisition étant effectuée selon un mode centroïde, la détection de masse est donc réalisée à partir de l'algorithme « centroïde ». Le niveau du bruit de fond est adapté pour chaque expérience en fonction de la hauteur de la ligne de base du chromatogramme. L'expérience ayant été dupliquée le cut-off a été défini entre 4.5^{E6} et 5.5^{E6} pour la MS1 et entre 5.0^{E3} et 5.5^{E3} pour la MS2.

- Construction des chromatogrammes :

La construction des chromatogrammes est réalisée à partir de l'algorithme ADAP chromatogram builder. Les analyses ADAP ou Automated Data Analysis Pipeline ont notamment été développées pour les approches par LC-MS/MS.

Les paramètres sélectionnés sont les suivants :

- Chaque pic doit être constitué d'au minimum 4 points
- L'intensité minimale la plus élevée qui correspond à l'intensité du plus petit pic détecté était adaptée à chaque run et variait entre 5.0×10^6 et 9.0×10^6
- La tolérance était de 0.001 m/z ou 5 ppm, valeur très basse permise par l'utilisation d'un automate muni de la technologie Orbitrap.

Pour chaque échantillon nous obtenons un spectre. Le chromatogramme brut du SCFM est présenté dans la figure 68. Nous avons également validé la construction du chromatogramme sur des échantillons d'exométabolome comme celui représenté sur la figure 69.

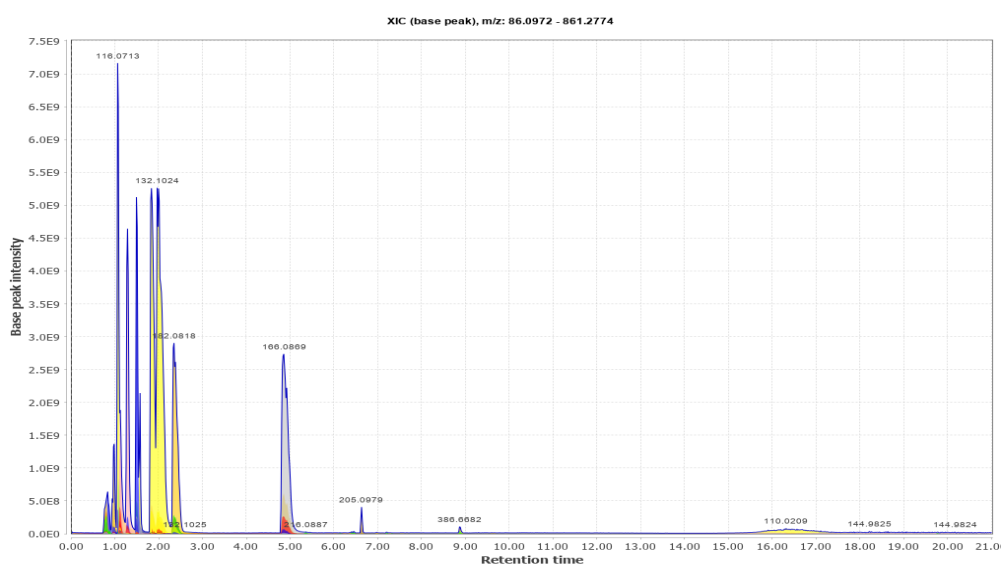


Figure 68 - Chromatogramme obtenu lors de l'analyse des composants du milieu de culture SCFM seul.

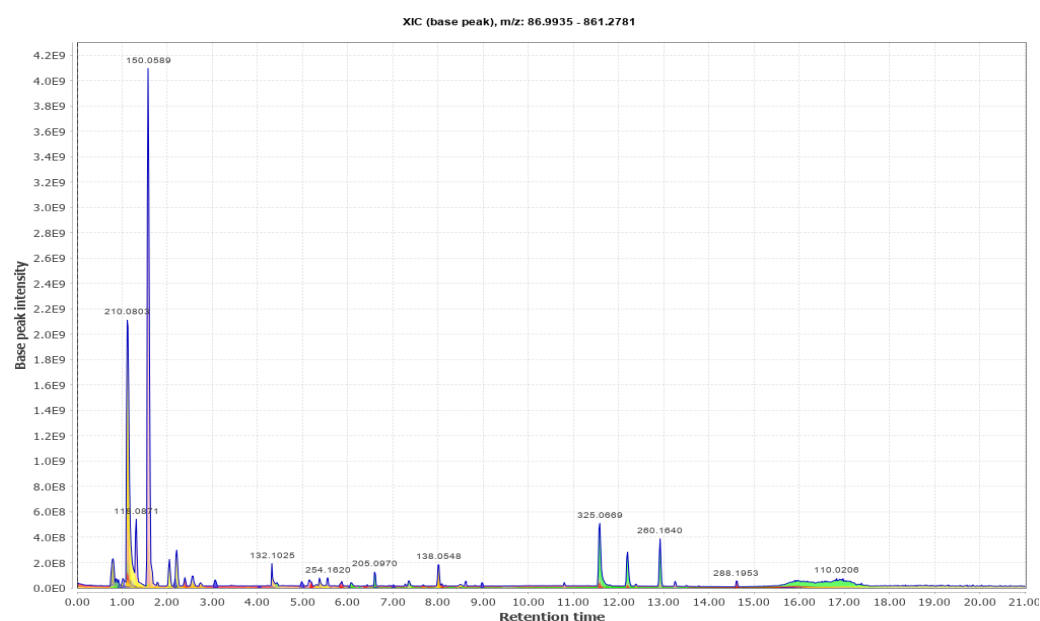


Figure 69 - Exemple de chromatogramme de l'exométabolome des souches cliniques. Par rapport au chromatogramme précédent, la quantité des acides aminés a diminué (pics présents notamment au début du chromatogramme) et un ensemble de pics de plus faible intensité sont apparus correspondant aux métabolites excrétés par les souches.

- Déconvolution des chromatogrammes :

Cette étape permet de détailler le chromatogramme en pics individuels. L'optimisation de la déconvolution est passée par une adaptation de l'algorithme habituellement utilisé « Baseline cut-off ». Cet algorithme ne permettait pas d'obtenir des pics de bonne qualité : la largeur des pics était trop importante (Figure 70 A), et l'ensemble des pics d'intérêts n'étaient pas pris en compte dans l'analyse, comme le double pic généré par la Leucine et l'Isoleucine (Figure 71 A). Ainsi les paramètres retenus étaient les suivants : nous avons utilisé l'algorithme Wavelet ADAP avec un rapport signal/bruit défini à 10, la hauteur minimale du pic était similaire au seuil défini pour l'intensité minimale. Pour sélectionner l'ensemble des pics, le seuil du coefficient de l'aire sous la courbe (AUC) a été défini à 50.

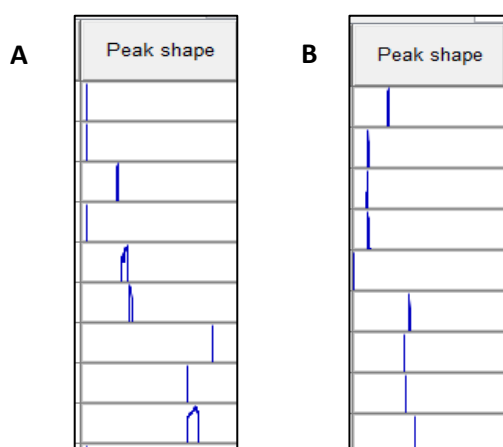


Figure 70 :

Evaluation des résultats de l'optimisation de la déconvolution. L'aspect de quelques pics issus des chromatogrammes après utilisation du « Baseline cut-off » est représenté sur la figure de gauche (A) et l'aspect de ces mêmes pics est représenté après utilisation de l'algorithme « Wavelet adapt » (B). L'optimisation de la déconvolution permet d'obtenir des pics plus fins, de meilleure qualité.

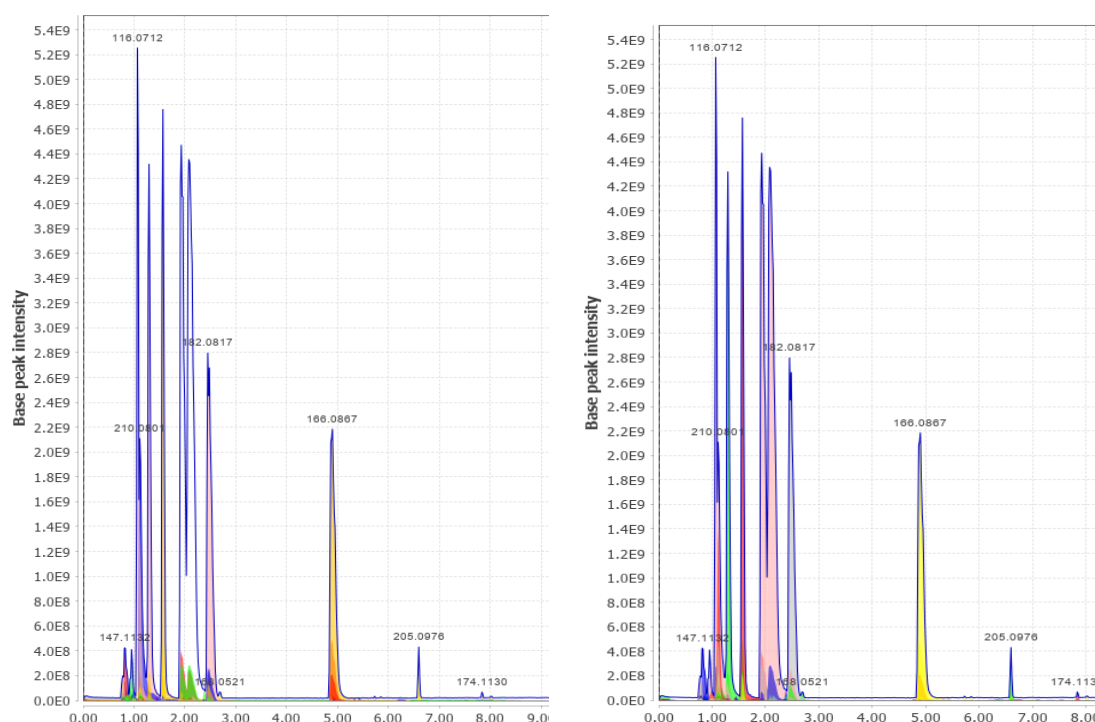


Figure 71 – Optimisation de la sélection des pics de chromatographie. L'ensemble des pics sélectionnés après déconvolution sont colorés. Pour certains pics, le rapport signal sur bruit ou la largeur peuvent empêcher leur détection alors qu'il s'agit de métabolites d'intérêts et ceci nécessite une optimisation.

- **Identification et rassemblement des isotopes :**

Pour identifier et regrouper les isotopes d'une même molécule, nous avons utilisé l'algorithme « *isotopic peak grouper* » avec pour tolérance en m/z : 0,001 m/z ou 5ppm et pour tolérance au niveau du temps de rétention (RT) 0.2min. La charge maximum était de 3 et l'isotope représentatif est le plus intense.

- **Alignement des spectres :**

L'alignement des spectres a pour objectif de faire correspondre les pics similaires retrouvés dans les spectres des échantillons d'un même batch. L'algorithme utilisé est le « *join aligner* » qui réalise un alignement en fonction d'un score de correspondance calculé en prenant en compte la masse et le RT du chaque pic. Le poids accordé à la masse et au RT sont de 75% et 25% respectivement. La tolérance choisie pour le rapport masse sur charge est la même que dans les précédentes étapes à savoir 0.001 m/z ou 5ppm, et pour le RT : 0.2min. Pour réaliser l'alignement, les features devaient avoir la même charge.

- **Filtration des données (FLRF) :**

Les étapes jusqu'au groupement des isotopes ont pu être validées sur l'analyse des spectres. Cependant, à partir de la filtration des données, nous n'avons plus de critères objectifs pour pouvoir valider les résultats de l'algorithme utilisé. De plus, nous n'avons pas pu identifier sur quels critères la filtration des données était effectuée par les algorithmes proposés par MZmine. Cette étape du pré-processing des données n'a donc pas été conservée. Les features qui n'étaient pas présents dans au moins 3 échantillons ont cependant été éliminés (ce qui correspond à au moins un triplicat d'échantillon). L'objectif de notre analyse est d'identifier de nouveaux métabolites ayant des propriétés immunomodulatrices, cette étape de filtration a été limitée au maximum pour ne pas éliminer de features qui pourraient constituer des métabolites d'intérêt.

- **Remplacement des données manquantes ou « Gap filling » :**

De nombreuses données manquantes sont générées au cours de l'analyse de données massives. Elles peuvent être générées parce que le métabolite n'est pas présent dans l'ensemble des échantillons, ou parce qu'il n'a pas été mis en évidence au cours des étapes d'acquisition que ce soit au niveau de l'étape de séparation par la chromatographie liquide, ou au cours de l'analyse par spectrométrie de masse, mais aussi par l'étape de prétraitement des données. Le Gap Filling permet donc de compenser les valeurs manquantes. Cependant, nous avons pu observer des valeurs élevées attribuées pour certains métabolites dans les blancs, mettant en évidence un biais au cours de la compensation des données manquantes. De plus, une analyse effectuée sur les SI a mis en évidence

que l'algorithme modifiait l'intensité ionique des pics déjà obtenus au cours des étapes précédentes. Certaines des valeurs attribuées semblaient ainsi être aberrantes, comme nous pouvons l'observer sur la Figure 72. Après filtration des données, l'ensemble des valeurs obtenues pour l'Amitriptyline sont très stables, avec seulement 3 points pour lesquels nous retrouvons des valeurs d'intensité ioniques légèrement plus faibles. Le point représenté en bas à droite du graphique est un blanc. Si l'on regarde ensuite ces mêmes valeurs d'intensité après réalisation du Gap Filling, nous voyons que les valeurs attribuées se trouvent dans un intervalle beaucoup plus important. Si certaines étapes ont pour objectif de rééquilibrer chaque échantillon en fonction de l'intensité ionique totale, ce n'est pas l'objectif de cet algorithme. Cette modification de la valeur de l'AUC n'est donc pas justifiée. De la même façon, nous voyons que la valeur du blanc ne se trouve plus à 0, pour une molécule pourtant absente de l'échantillon. Cet algorithme ne permet donc pas de « retrouver » certains features mais semble faire une compensation des données manquantes, qui est réalisée par ailleurs par les autres logiciels risquant alors d'imputer une valeur élevée pour des métabolites qui sont pourtant absents des échantillons au départ. L'étape de Gap filling n'a donc pas non plus été conservée.

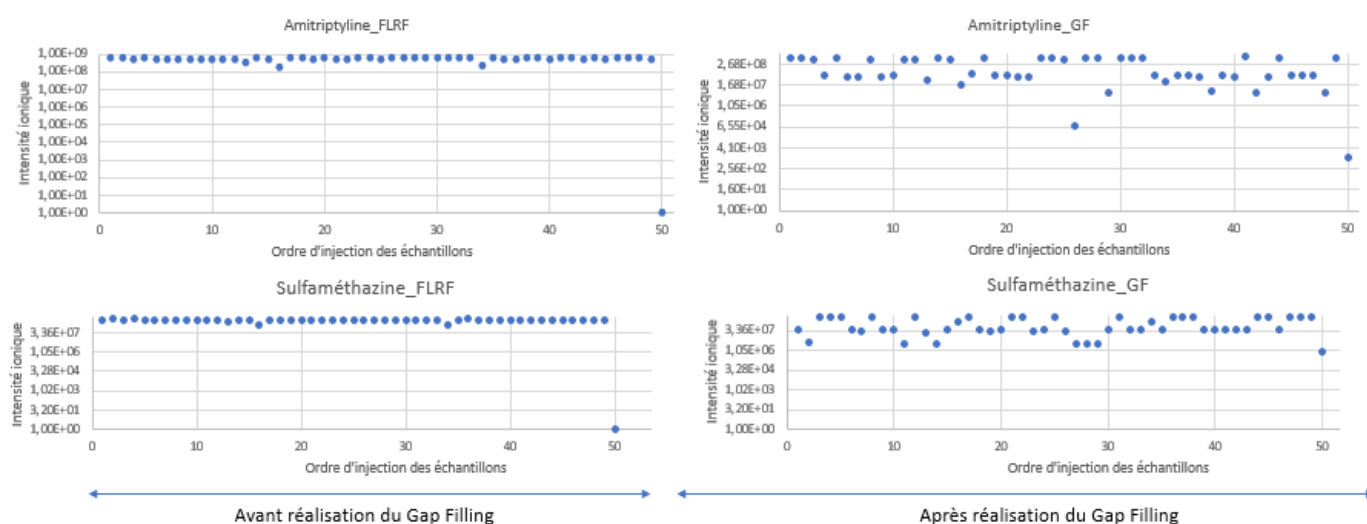


Figure 72 – Evaluation de l'impact de l'algorithme « Gap filling » sur les valeurs d'intensité des SI. Sur la gauche de la figure sont représentés l'Amitriptyline et la Sulfaméthazine avant réalisation du « Gap filling » puis après modification par l'algorithme.

➤ 4.2. Pré-processing par R

Nous avons comparé les résultats obtenus par MZmine à ceux générés sur le script interne à la plateforme GExiM, établi par F. Fiorini sur R Studio. Les packages utilisés étaient notamment XCMS et CAMERA. Les 3 grandes étapes étaient les suivantes (détaillées dans Bioconductor, pré-processing des données obtenues par LC-MS/MS par le package XCMS) :

- La détection des pics chromatographiques, réalisée avec l'algorithme « centWave », largeur des pics : 10 à 30. Cette étape du pré-processing comprends l'étape de déconvolution présenté dans les analyses par MZmine.
- L'alignement, étape qui correspond à la correction du temps de rétention, a été réalisé avec l'algorithme « obiwrap ».
- La dernière étape consiste à réaliser la correspondance entre les pics, c'est-à-dire de faire correspondre les pics entre les différents échantillons.

Pour obtenir les données les plus comparables entre les méthodes, nous n'avons pas réalisé de Gap filling.

➤ 4.3. Validation de l'expérimentation et contrôles qualité des données obtenues

Pour obtenir des résultats robustes, chaque échantillon a été injecté en triplicat, de façon randomisée. La validation de l'expérimentation nous permet d'évaluer l'intensité ionique totale des échantillons en fonction de l'ordre d'injection mais également en fonction des triplicats d'injection. Ces deux analyses, nous permettent d'apprécier l'effet batch et l'existence de potentiels outliers respectivement. Les données ont ensuite été filtrées afin de ne sélectionner que les données robustes. Nous avons d'abord observé l'ensemble des intensités ioniques de chaque échantillon en fonction de l'ordre d'injection. Certains échantillons présentaient une intensité ionique anormalement basse qui avaient été identifiée au cours du batch et qui était notamment due à des problèmes d'injection, dans ce cas les injections avaient été dupliquées (Figure 73).

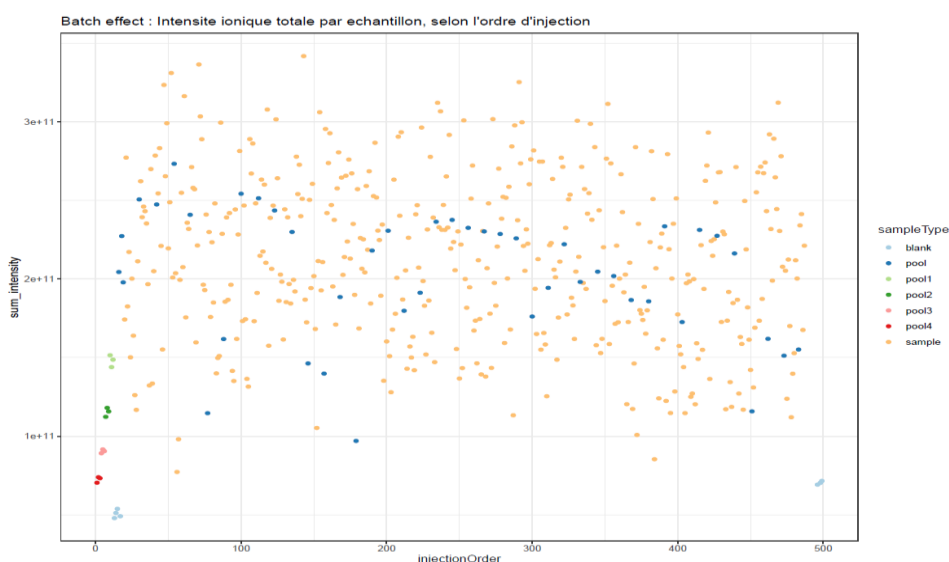


Figure 73 - Représentation de l'intensité ionique totale de chaque échantillon au cours de l'acquisition. Les blancs ont été injectés en début de séquence et en fin de séquence. Les QC (notés pools dans la légende) sont injectés tout au long de la séquence et les pools 1 à 4 qui correspondent à la dilution en cascade du QC. L'intensité ionique de l'ensemble des échantillons se trouvent entre $1 \cdot 10^{11}$ et $3 \cdot 10^{11}$ ce qui montre la qualité de l'analyse et permet d'éliminer de premier outliers potentiels.

1- Dérive intra batch

La dérive intra batch est due à l'encrassement de l'appareil ou à une altération des échantillons au cours du temps pour des acquisitions longues. Elle est évaluée et rectifiée grâce à l'injection des contrôles qualités (QC) tout au long de l'acquisition. Les QC sont constitués lors de la reconstitution des échantillons en poolant 5µl de chaque échantillon, et sont injectés tous les 10 échantillons. Au total, 45 acquisitions ont été réalisées par expérimentation. Nous avons pu observer un effet batch, après environ 250 injections (Figure 73), que nous avons corrigé par W4M. Une analyse permettant de comparer les différentes méthodes de correction pour un métabolite a été effectuée et cette modélisation nous a permis de sélectionner l'algorithme de Loess comme le plus adapté pour prendre en compte les variations d'intensité ionique des QC.

2- Intensité ionique totale selon le type d'échantillons :

La représentation de l'intensité ionique totale des QC et des échantillons, permet d'évaluer la reproductibilité au cours des injections et d'identifier des échantillons qui constitueraient des outliers. La première figure (Fig 74A) met en évidence l'intensité ionique totale par patient en prenant en compte les échantillons des 2 phases de croissances. L'ensemble des intensités ioniques totales des patients se trouve dans l'intervalle $1,0 \times 10^{11}$ – $3,0 \times 10^{11}$ (Fig 74B). Sur cette représentation, aucun échantillon ne constituait un outlier mais ceci nous a permis d'identifier des réplicats d'injection présentant une intensité ionique totale anormalement basse ou haute, non conservés.

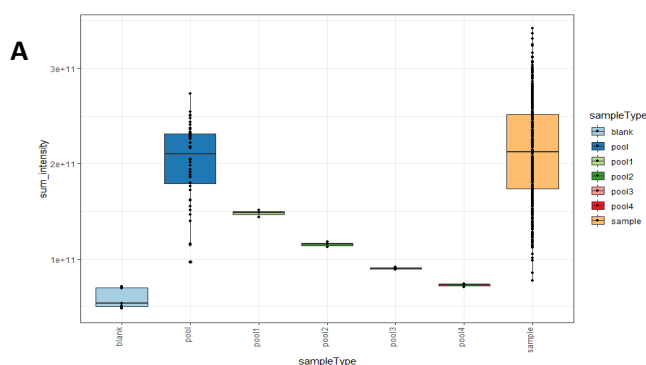
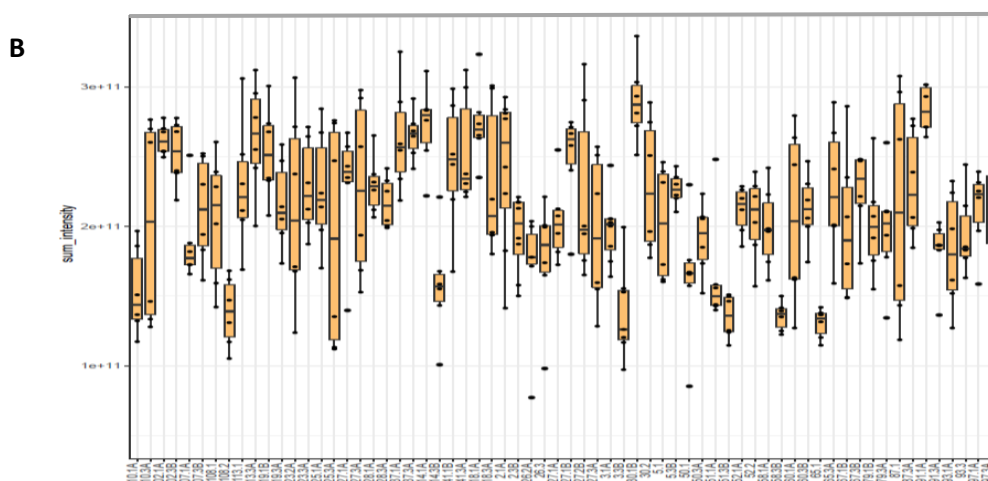


Figure 74 : Représentation des intensités ioniques totales par groupe (A) et par patient (B). L'intensité ionique des groupes montre une que les QC (bleu foncé) sont au même niveau que les échantillons (jaune). Les QC dilués montrent une diminution de l'intensité proportionnelle à la dilution, enfin les blancs sont en dessous de tous les échantillons. L'intensité ionique par patient permet d'identifier d'éventuels échantillons outliers



3- Filtration des données en fonction de leur qualité.

Les données sont ensuite triées sur leur qualité selon différents critères à l'aide de W4M. Les features dont le rapport signal sur bruit n'est pas supérieur à 33% sont éliminés. La robustesse des données est ensuite évaluée par rapport aux valeurs des features dans le QC qui a été dilué au demi, au quart, au 8^{ème} et au 16^{ème}. Ceci permet d'identifier les features dont le CV ne suivrait pas le coefficient de dilution, le seuil fixé par rapport à la droite de corrélation était de 0,6.

4- Bilan des données obtenues sur colonne C18 :

Nous obtenons après avoir réalisé le pré-processing des données une table de données contenant 8164 métabolites par MZmine et 8834 par R. Après réalisation du tri des données, nous obtenons 4180 features qui ont fait l'objet des analyses statistiques présentées par la suite.

➤ 4.4. Présentation des données obtenues par acquisition sur colonnes HILIC

Le nombre de features obtenus après la réalisation des mêmes étapes de pré-processing est moins important que lors de l'analyse en colonne C18, nous en obtenons 4380 features avant filtration des données. Nous remarquons aussi 15% de données manquantes supplémentaires. Au cours de cette acquisition nous n'avons pas observé de dérive intra batch. Après filtration et validation des données, nous obtenons un fichier à 2018 features. Les échantillons ont été normalisés sur les SI. Cependant la comparaison des features obtenus par analyse C18 et HILIC ne nous a pas permis de mettre en évidence de nouveaux features intéressants pour nos analyses. Par cette approche, nous n'avons pu identifier que 60 métabolites par GNPS. Les résultats présentés par la suite sont générés avec les résultats obtenus par C18 et validés dans un 2nd temps par les résultats obtenus par HILIC

II. Caractérisation du SCFM

1. Acquisition de l'ensemble des constituants

L'étude de l'exométabolome est complexe car les quantités de métabolites excrétées dans le milieu peuvent être faibles. Cet aspect est pallié en partie par l'utilisation de milieux peu concentrés, avec un minimum de constituants dits milieux « minimum ». Cela est également permis par le SCFM (cf chapitre I). Il faut ensuite s'affranchir du milieu de culture pour pouvoir évaluer quels sont les métabolites qui ont été excrétés et en quelle quantité (relative). Pour ce 2^{ème} aspect, nous avons caractérisé l'ensemble des constituants du SCFM qui ont été passés de façon purifiée avec la même technique d'acquisition et la même colonne de chromatographie, afin d'identifier chaque pic constituant le chromatogramme ainsi que le rapport m/z, le temps de rétention et le spectre MS2 de chaque feature (tableau XV). Aucun résultat concernant la glycine n'a pu être obtenu étant donné que son poids moléculaire est inférieur à l'intervalle sélectionné allant de 85 à 1275 m/z.

Réactif	MW (g/mol)	m/z	RT (min)	Réactif	MW (g/mol)	m/z	RT (min)
Sérine	105.09	106.05	0.92	Lysine	146.19	147.113	0.86
Glutamine	146.14	147.06	0.97	Arginine	174.2	175.119	0.90
Proline	115.13	116.070	1.07	Asparagine	132.12	134.044	0.92
Glycine	75.07	/	/	Tryptophane	204.22	205.097	6.54
Alanine	89.09	90.055	0.94	Tyrosine	181.19	182.082	2.32
Valine	117.15	118.086	1.29	Thrénine	119.12	120.065	0.94
Méthionine	149.21	150.058	1.55	Cystéine	121.16	122.0277	1
Isoleucine	131.17	132.102	1.90	Phénylalanine	165.19	166.087	4.69
Leucine	131.17	132.102	1.96	Histidine	155.15	156.076	0.87
Ornithine	132.16	133.097	0.85	MOPS	209.27	210.079	1.12

Tableau XV : Caractérisation des constituants du milieu de culture SCFM sur colonne C18 selon la méthode d'acquisition.

Les pics obtenus pour chaque métabolite ont été superposés afin de reconstituer le chromatogramme complet du SCFM et annoter les pics. La figure 75 représente l'ensemble des constituants avec l'annotation correspondante. Ces résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus avec le SCFM complet (Figure 68), nous avons ainsi pu montrer que nous obtenions le même chromatogramme avec des temps de rétention similaires. Il n'y a donc pas d'effet matrice entre les composants du SCFM.

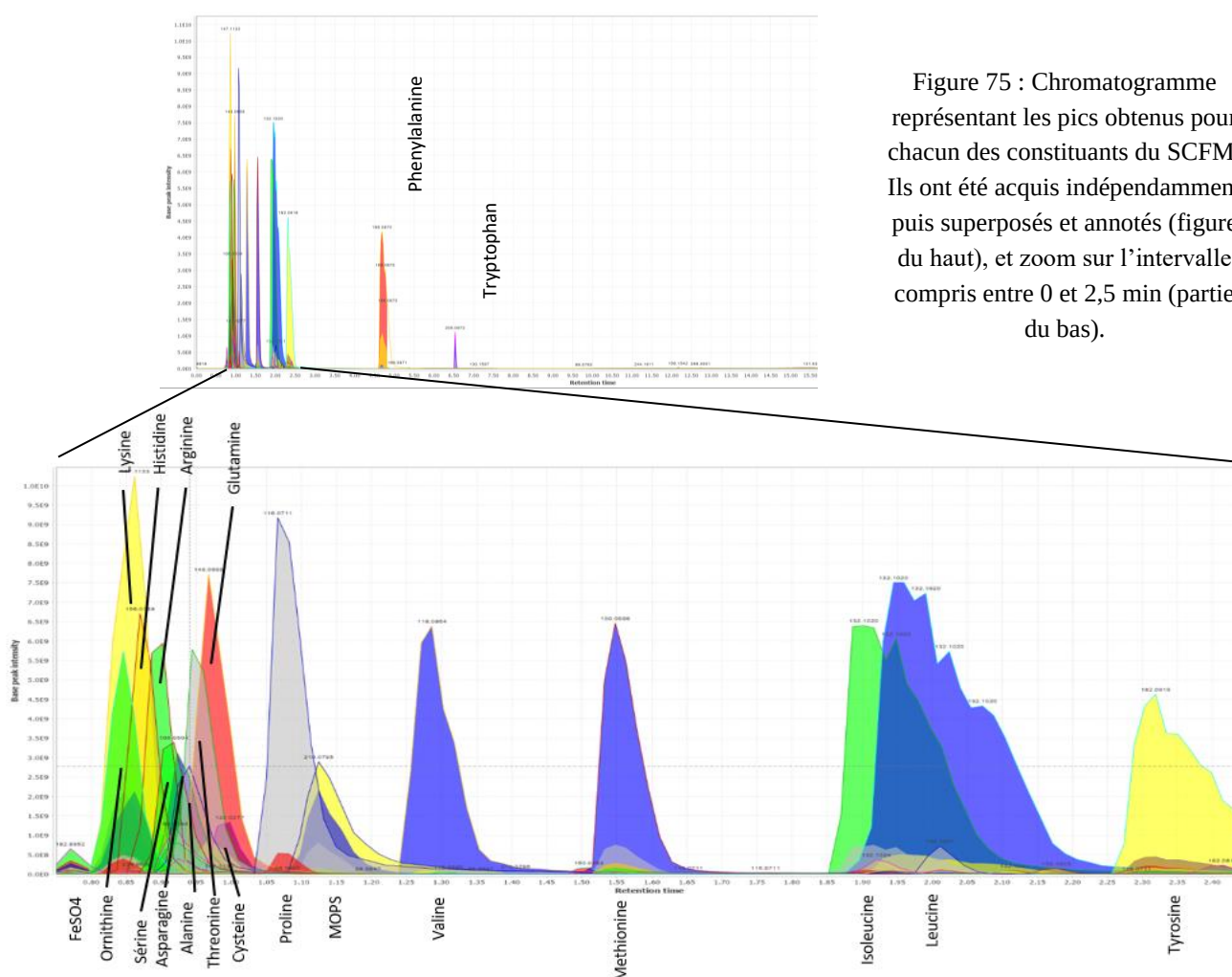


Figure 75 : Chromatogramme représentant les pics obtenus pour chacun des constituants du SCFM. Ils ont été acquis indépendamment puis superposés et annotés (figure du haut), et zoom sur l'intervalle compris entre 0 et 2,5 min (partie du bas).

2. Consommation et production de métabolites d'intérêts :

Les chromatogrammes obtenus ont permis de mettre en évidence un ensemble de métabolites consommés et produits, avec une diminution de l'intensité des pics présents au début du chromatogramme, correspondant notamment aux acides aminés et l'apparition de pics de plus faible intensité tout au long du chromatogramme. Un exemple de chromatogramme d'exométabolome des souches cliniques a été représenté sur la figure 76. Ces différences sont visibles dès la phase de croissance exponentielle et s'accroissent encore en phase stationnaire. La consommation du milieu de culture a également été mise en évidence par la diminution marquée de l'intensité ionique totale des échantillons, par rapport à ce que l'on pouvait observer concernant le SCFM. Cette diminution s'accroît au cours de la culture des souches, donc entre la phase de croissance exponentielle et stationnaire. Les métabolites relargués dans le milieu ne compensent pas la consommation du milieu qui permet également aux souches de vivre et de se multiplier.

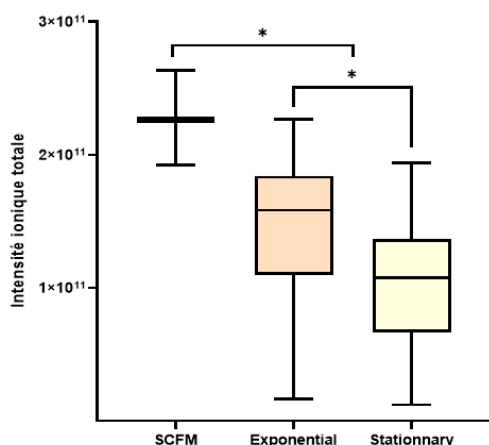


Figure 76 :
Comparaison des intensités ioniques totales des différentes phases de croissance par rapport au milieu de culture. L'intensité ionique totale du SCFM est plus importante que celles obtenues après croissance des souches. Le milieu est consommé avec la croissance des souches expliquant les différences observées entre les deux phases

Pour la suite des analyses, nous avons normalisé l'intensité ionique de chaque feature par l'intensité ionique du métabolite dans le milieu de culture. Ceci nous a permis de nous affranchir au maximum des constituants du milieu de culture pour pouvoir nous concentrer sur l'exométabolome des souches.

III. Identification des features d'intérêts

Ces analyses nous ont permis de faire ressortir des features d'intérêt. Il s'agit maintenant de les identifier à partir de leur rapport m/z et de leur temps de rétention. Pour cela, nous avons utilisé des bases de données publiques directement ou par l'intermédiaire de MZmine, telles que :

- KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes²⁶⁶
- PAMDB : Pseudomonas Aeruginosa Metabolome Database²⁶⁷

Ces deux bases de données sont très informatives en ce qui concerne l'étude du métabolome bactérien et plus particulièrement sur Pa pour la base de données PAMBD.

En parallèle nous avons réalisé des analyses par GNPS (Global Natural Products Social Networking). Cet outil nous permet d'identifier les features à partir des données de MS1 mais aussi sur de MS2. Pour cela nous utilisons comme outil d'analyse avancé le Feature Base Molecular Networking (FBMN) qui nous permet d'identifier 276 features en C18 et 60 en HILIC. GNPS nous permet également de générer un fichier analysable par Cytoscape.

Le logiciel Cytoscape génère des réseaux moléculaires en se basant sur les spectres de MS2. Il permet d'étudier des molécules ayant des similarités spectrales et d'évaluer comment elles diffèrent. Cet outil nous a également permis de relier des features pour lesquels nous n'avions aucune identification à des métabolites annotés, nous permettant de caractériser le métabolite comme une molécule apparentée. Les figures que nous avons générées relient différentes molécules apparentées entre elles mais mettent également en évidence l'interconnexion entre les différentes voies métaboliques comme représenté sur la figure 77 où l'on observe de façon simultanée des molécules apparentées à la voie métabolique du tryptophane, mais également des molécules appartenant à la voie métabolique de la méthionine ou enfin à la voie de biosynthèse de la Phénazine.

Une dernière approche a été utilisée pour identifier les features, il s'agissait de SIRIUS qui fait une annotation computationnelle des spectres de fragmentation.

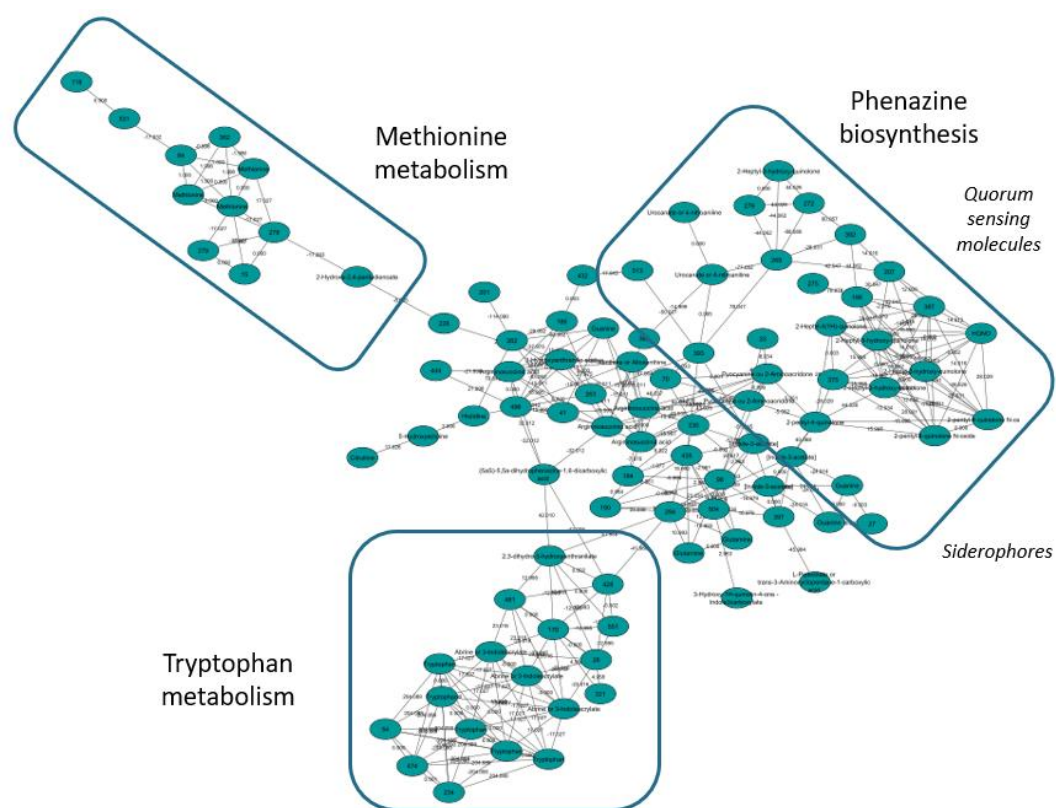


Figure 77 - Représentation d'un des réseaux générés par Cytoscape sur les données de métabolomique. Les réseaux sont générés à partir des spectres MS2, permettant ainsi d'observer l'organisation de molécules apparentées et de proposer des identifications supplémentaires. Les métabolites appartenant à 3 voies métaboliques sont observés : la voie métabolique du Tryptophane, de la Méthionine et de la Phénazine.

IV. Analyses statistiques des données générées par métabolomique et intégration biologique

Les données obtenues après l'étape de pré-traitement ont ensuite fait l'objet de différentes analyses statistiques réalisées par MetaboAnalyst ou R studio. Les données manquantes ont été compensées en attribuant une valeur faible correspondant au 1/5^{ème} de la valeur la plus basse détectée pour chaque feature afin de ne pas influencer les analyses statistiques.

1. Normalisation

L'analyse débute par une normalisation des échantillons et des données pour lesquels nous avons évalué différentes techniques.

➤ *Normalisation des échantillons :*

Nous avons comparé des méthodes de normalisation des échantillons par :

- La somme
- La médiane des intensités ioniques
- Le PQN qui utilise un échantillon comme référence, en l'occurrence un QC.

Les résultats observés pour chacune d'entre elles, étaient les courbes de normalisation générées par MetaboAnalyst. La technique de normalisation par la somme n'a pas été retenue car la représentation de la normalisation obtenue est la plus éloignée de la courbe gaussienne attendue par rapport aux deux autres. D'autant plus que cette approche peut être biaisée par de potentiels outliers. La comparaison des deux autres techniques, la normalisation par la médiane ou par le PQN, met en évidence une normalisation des features meilleure par la normalisation par la médiane et permet de s'affranchir des résultats obtenus pour un seul échantillon (Figure 78 A).

➤ *Normalisation des features :*

Les données ont été transformées en données logarithmiques, puis nous avons analysé différents algorithmes pour obtenir des données centrées et réduites : le « pareto scaling » et « l'auto-scaling ». Les résultats obtenus par l'auto scaling permettent d'obtenir la meilleure normalisation (Figure 78 B).

Pour la suite des analyses, la normalisation des échantillons a donc été réalisée sur la médiane de l'intensité ionique, et les données ont été centrées et réduites par l'utilisation de l'algorithme « auto-scaling » et transformées en données logarithmiques. Ces différents types de normalisation ont également été comparés sur nos différents jeux de données et ont été validés pour toutes les analyses.

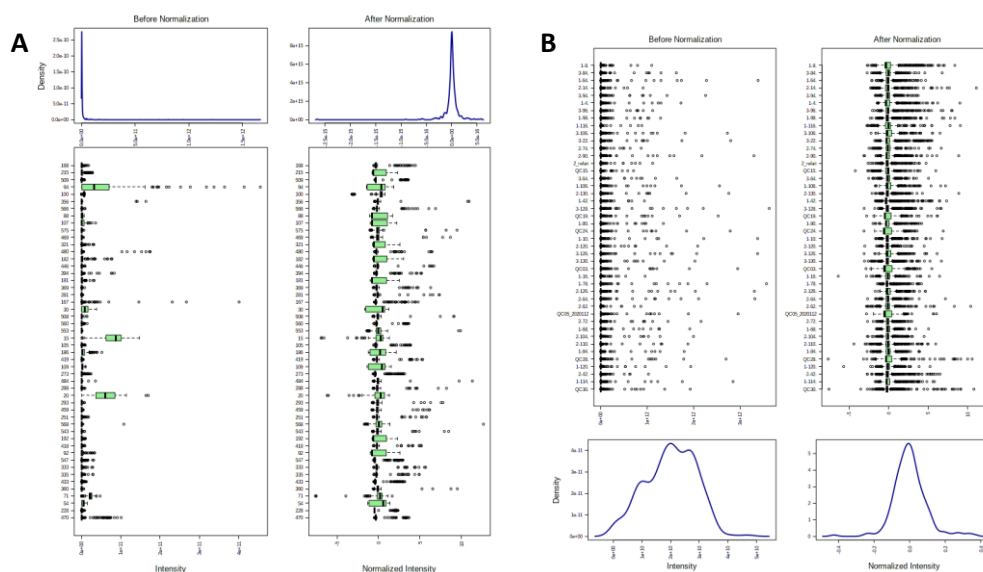


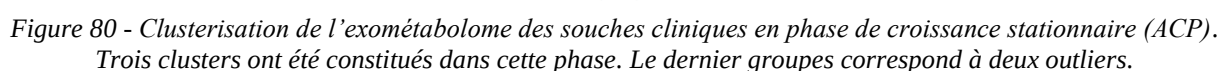
Figure 78 – Résultats de la normalisation réalisée pour les features (A) et les échantillons (B). Sur chacune des figures la partie de gauche représente l'état basal et la partie de droite la répartition obtenue après normalisation

2. Analyses non supervisées de l'exométabolome des souches

Après réalisation de l'ensemble des étapes du pré-traitement des données, nous avons effectué une analyse statistique des données obtenues. Une 1ère analyse ACP réalisée par R studio a permis d'obtenir une clusterisation pour chaque phase de croissance. Par cette approche les données sont centrées et réduites. De façon intéressante, des résultats similaires à ceux observés par le test immunologique *in vitro* ont été retrouvés, avec 2 clusters dans la phase de croissance exponentielle (fig. 79) et 3 clusters dans la phase de croissance stationnaire (figure 80). Il y a pour chacune des phases 2 isolats qui ont été identifiés comme outliers et qui n'ont pas été inclus pour la suite des analyses. Nous avons ainsi identifié différents types de souches en fonction de la production et de la consommation des différents métabolites. Les souches partageant les mêmes caractéristiques sont regroupées au sein de clusters. Par la suite, nous chercherons à identifier quels sont les métabolites qui caractérisent chaque cluster et quel est leur impact sur l'hôte ou sur les autres pathogènes.



Figure 79 :
Clusterisation de
l'exométabolome des souches
cliniques en phase exponentielle
de croissance par analyse ACP,
non supervisée.
2 clusters différents ont été
constitués, le 3^{ème} groupe
correspond à des outliers.



Les analyses supervisées ont été réalisées à l'aide de MetaboAnalyst. Nous avons évalué si une modification de l'exométabolome des souches était visible en fonction de certains paramètres comme la phase de croissance ou en fonction du moment de recueil de l'isolat, Précoce ou Tardif. Ceci pouvant mettre en évidence une adaptation du métabolisme des souches. Les analyses ont été réalisées sur le fichier généré après alignement, sur les données normalisées sur l'expression du SCFM. De façon systématique, nous avons réalisé une ACP (analyse non supervisée) pour observer la répartition des échantillons puis des analyses supervisées. Ces analyses permettent de mettre en évidence les métabolites dont l'expression diffère entre les groupes.

- Une PLS-DA, celle-ci permet également d'identifier des « VIP », c'est à dire les métabolites les plus discriminants entre les groupes. Ils sont pris en considération pour un score ≥ 2 .
- Un t-test, ou une analyse ANOVA en fonction du nombre de groupes. Le T-test est accompagné d'une représentation en volcano plot, ou le seuil du fold change est défini à 2.
- Une représentation en dendrogramme pour analyser la répartition des échantillons.
- Une représentation en Heatmap permet de coupler les analyses précédentes sur la répartition des échantillons et l'expression des différents features entre les groupes.
- Une clusterisation par 2 méthodes, l'algorithme des Kmeans et SOM (Self Organizing Map)

205

➤ 3.1. Comparaison de l'exométabolome entre les phases de croissance

La répartition des échantillons selon la représentation en ACP nous a permis de mettre en évidence une séparation en fonction de la phase de croissance, les échantillons étaient déjà séparés sur ce type d'analyse non supervisée (Figure 81).

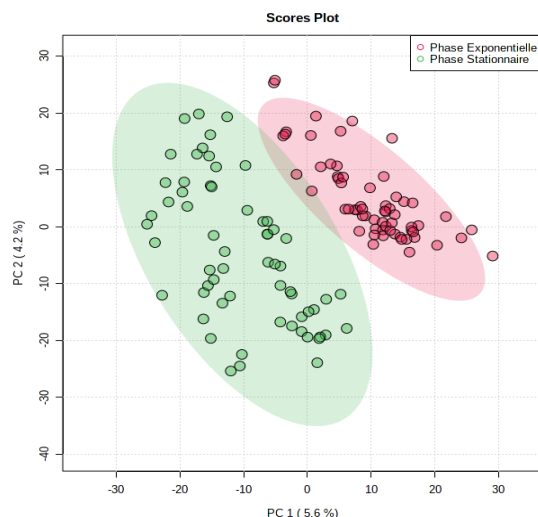


Figure 81 :
Représentation ACP de
l'exométabolome des souches en phase
de croissance exponentielle et en phase
stationnaire. Une séparation est
observée entre les deux phases, par
une analyse pourtant non supervisée
avec un score qui reste faible à 5,6%.

Les scores de séparation sont cependant faibles, sur le nombre de features pris en compte pour l'analyse nombreux sont communs aux deux phases de croissance. La représentation en PLS-DA maximise cette différence, mais comme présenté auparavant, chaque composante représente moins de 10% dans la séparation des échantillons (figure 82 A). Nous avons cependant pu observer un R^2 de 0,91 et un score Q^2 de 0.86, dès la première composante, comme représenté sur le tableau XVI, mettant en évidence la qualité du modèle. L'analyse PLS-DA a fait ressortir 200 features considérés comme des VIP avec un score ≥ 2 , une majorité est surexprimée au cours de la phase stationnaire (Fig 82 B).

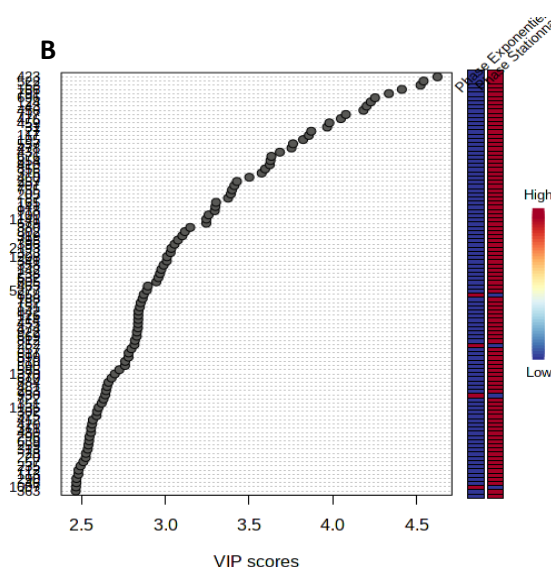
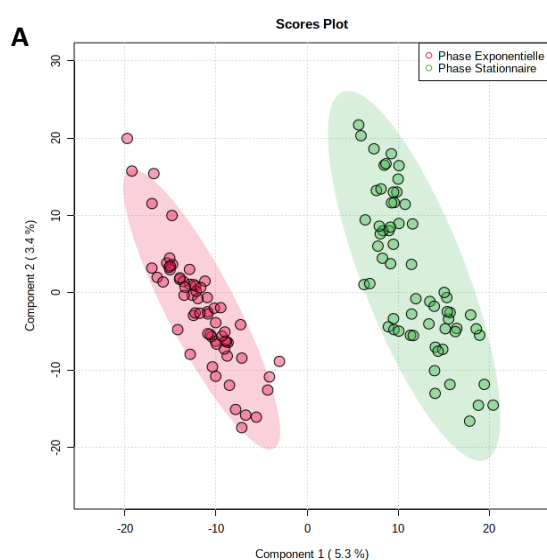


Figure 82 – Analyse supervisée des exométabolomes en fonction de la phase de croissance. La représentation PLS-DA montre une séparation marquée entre les groupes mais un score faible de 5,3% (A). Les features permettant de séparer les groupes sont nommés VIP et sont significatifs à partir d'un score de 2 (B).

PLS-DA cross validation details:

Measure	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps
Accuracy	1.0	1.0	1.0	1.0
R2	0.91009	0.97043	0.98977	0.99646
Q2	0.86067	0.91371	0.92756	0.93061

Tableau XVI :
Scores R2 et Q2 pour chaque
composante du modèle PLS-DA

Nous avons alors complété notre analyse par un T-test mettant en évidence cette fois ci 598 métabolites discriminants. La représentation en volcano plot permet d'évaluer le nombre de features exprimés de façon différentielle entre les phases de croissance, mais également s'ils sont surexprimés dans au cours d'une phase ou dans l'autre phase. Ainsi 622 features ont été mis en évidence comme surexprimés lors de la phase stationnaire et 285 en phase exponentielle (résultats non présentés). Concernant les métabolites surexprimés au cours de la phase exponentielle de croissance, il sera nécessaire d'analyser s'il s'agit de métabolites issus du milieu de culture ou se sont des métabolites excrétés qui pourraient être de nouveau consommés par la suite.

Nous avons ensuite analysé la répartition des échantillons en fonction de leur appartenance à chaque phase de croissance sur une représentation en dendrogramme et nous avons pu observer une très bonne distribution dans les deux bras avec quelques outliers (Fig 82). Pour compléter cette analyse avec l'expression des différents features au cours des deux phases de croissance, nous avons tout d'abord généré une heatmap sur l'ensemble des features, puis nous avons affiné sur les 900 métabolites les plus discriminants par analyse T-test pour conserver le même nombre de features que ceux mis en évidence par le Volcano plot (Fig 83A) et sur les 200 features mis en évidence par PLS-DA (Figure 83B). Il est intéressant de noter que sur cette dernière représentation la répartition des échantillons respecte parfaitement les groupes d'origine sans que l'analyse ne soit supervisée.

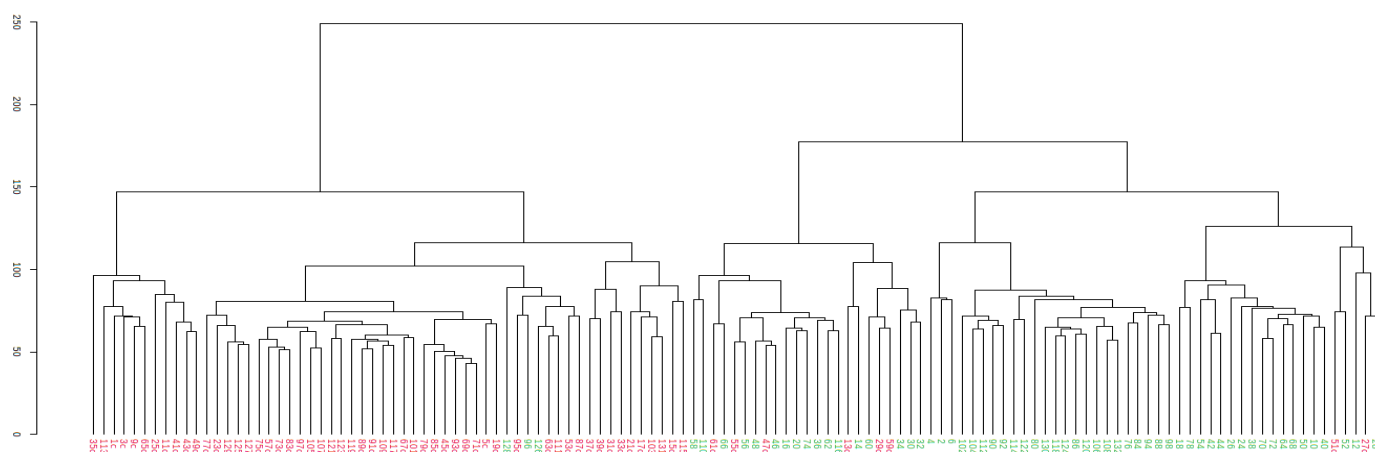


Figure 83 - Dendrogramme présentant la séparation des exométabolomes en fonction de la phase de croissance. Cette analyse non supervisée met en évidence une séparation des souches spontanément selon les deux phases.

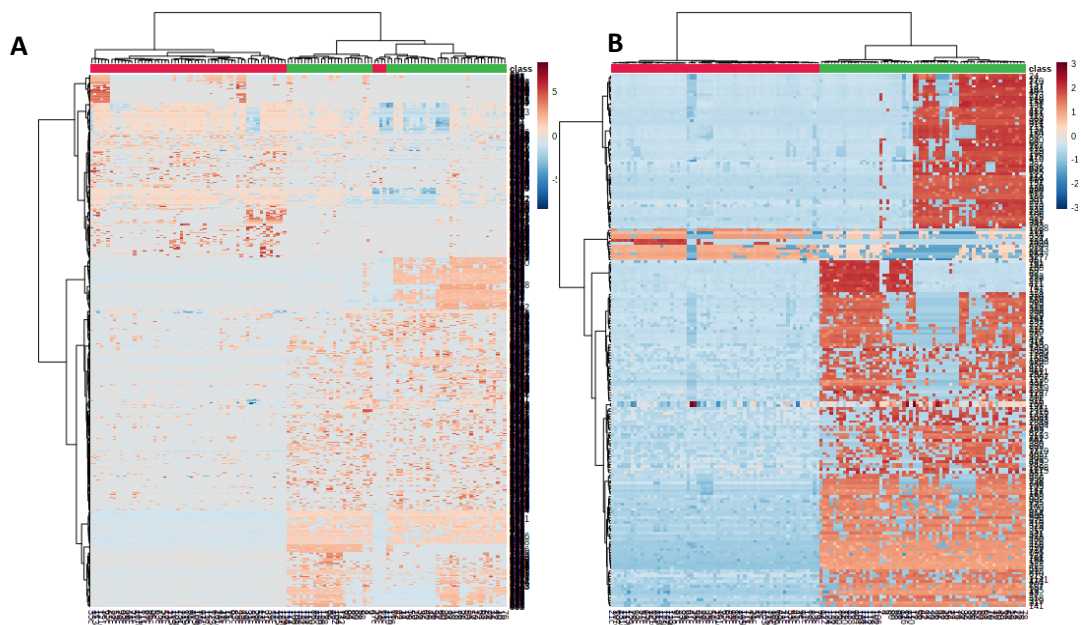
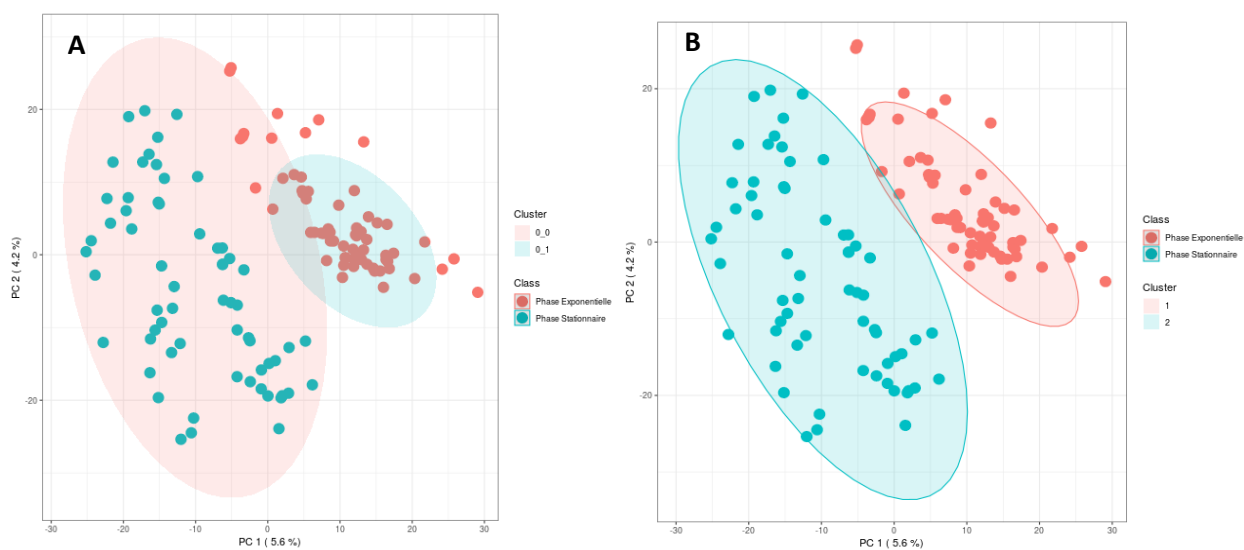


Figure 84 - Heatmap généré par t-test (A) ou PLS-DA (B) sur les features significatifs. Ces représentations permettent d'observer la concentration des métabolites dans chacun des clusters.

Enfin nous avons réalisé une clusterisation par la méthode des Kmeans (Fig 85A) ou SOM (Fig 85B) et nous avons pu mettre en évidence une répartition des exométabolomes similaire pour les 2 algorithmes, montrant une séparation fortement dépendante de la phase de croissance.



SOM clustering details:

Cluster	Members
Cluster (0, 0)	13c, 27c, 29c, 47c, 51c, 53c, 55c, 59c, 61c, 6, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 116, 118, 120, 124, 126, 128, 130, 132
Cluster (0, 1)	1c, 3c, 5c, 9c, 11c, 15c, 17c, 19c, 21c, 23c, 25c, 31c, 33c, 35c, 37c, 39c, 41c, 43c, 45c, 49c, 57c, 63c, 65c, 67c, 69c, 71c, 73c, 75c, 77c, 79c, 83c, 85c, 87c, 89c, 91c, 93c, 95c, 97c, 101c, 103c, 105c, 107c, 109c, 111c, 113c, 115c, 117c, 119c, 121c, 123c, 125c, 127c, 129c, 131c, 2, 4, 114, 122

K-means clustering details:

Cluster	Members
Cluster 1	1c, 3c, 5c, 9c, 11c, 13c, 15c, 17c, 19c, 21c, 23c, 25c, 27c, 29c, 31c, 33c, 35c, 37c, 39c, 41c, 43c, 45c, 47c, 49c, 51c, 53c, 55c, 57c, 59c, 61c, 63c, 65c, 67c, 69c, 71c, 73c, 75c, 77c, 79c, 83c, 85c, 87c, 89c, 91c, 93c, 95c, 97c, 101c, 103c, 105c, 107c, 109c, 111c, 113c, 115c, 117c, 119c, 121c, 123c, 125c, 127c, 129c, 131c
Cluster 2	2, 4, 6, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132

Figure 85 - Clusterisation des exométabolomes par la méthode SOM (A) et la méthode des Kmeans (B). La répartition des échantillons dans les clusters est représentée en bas avec les souches en phase stationnaire en rouge et en vert pour la phase exponentielle

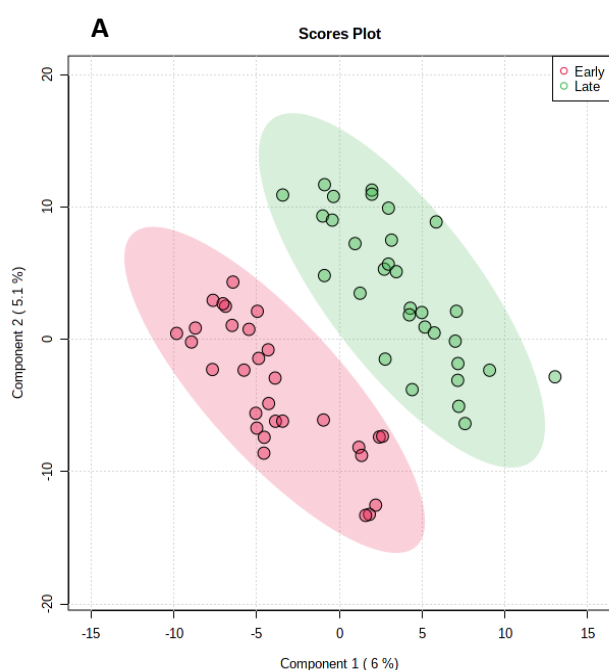
Ces résultats nous permettent de mettre en évidence une différence marquée dans l'exométabolome des souches en fonction de la phase de croissance et donc du métabolisme associé de la souche au cours de sa croissance.

➤ 3.2. Comparaison de l'exométabolome des souches Précoces et Tardives

Si aucune convergence d'évolution n'a pu être mise en évidence en évaluant l'endométabolome des souches (étudié lors de travaux antérieurs) ou sur leur aptitude à moduler l'immunité (présenté en deuxième partie de ce travail), l'exométabolome des souches prélevées de façon précoce ou tardive pourrait présenter des différences comme l'excrétion de métabolites conférant un avantage évolutif, tels que les sidérophores.

Cependant les analyses que nous avons réalisées ne nous ont pas permis de mettre en évidence de différences entre les souches Précoces et Tardives. Nous avons conduit une analyse supervisée par PLS-DA qui montre une mauvaise séparation des groupes objectivée par des scores inférieurs à 20% pour les premières et deuxièmes composantes, mais également par un faible score R2 et un score Q2 négatif (figure 86 A et B). Le score Q2 est négatif lorsque le modèle n'est pas prédictif du tout. Aux vues de ces résultats, nous n'avons pas complété cette analyse.

En conclusion, nous n'avons pas mis en évidence d'évolution convergente du métabolisme et de l'excrétion massive de métabolites par les souches Tardives en comparaison avec les souches Précoces.



B

PLS-DA cross validation details:

Measure	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps	5 comps
Accuracy	0.54333	0.42	0.52333	0.5	0.50667
R2	0.53791	0.8833	0.96969	0.99301	0.99833
Q2	-0.19803	-0.2183	-0.17001	-0.15858	-0.16253

Figure 86 : Analyses supervisées de l'exométabolome des souches Précoces (Early) et Tardives (Late). La représentation PLS-DA (A), montre une séparation de 6% sur la composante 1. Les scores R2 et Q2 associés sont faibles voir négatifs mettant en évidence qu'il ne s'agit pas d'un bon modèle (B).

➤ 3.3. Comparaison de l'exométabolome en fonction de la virulence des souches

Nous avons conduit une dernière analyse supervisée pour évaluer s'il y avait une corrélation entre les métabolites excrétés par les souches et leur phénotype de virulence. De nouveau, nous n'avons pas mis en évidence de corrélations entre ces deux paramètres. En effet, l'analyse par PLS-DA présentait des scores de 6% et 5% pour les composantes 1 et 2 respectivement et un score Q2 négatif pour toutes les composantes (résultats non présentés). Ces résultats sont concordants avec le fait que les facteurs de virulence bactériens ne sont pas médiés par des métabolites.

Nous avons cependant pu mettre en évidence que les surnageants de cultures pouvaient induire une surmortalité des CD lors des analyses sur les DC2.4. Nous avons donc conduit une analyse supervisée sur ce paramètre. Le modèle généré par PLS-DA était plus intéressant que les précédents avec un Q2 positif. Cependant, la séparation expliquée par les composantes 1 et 2 était encore faible, l'ensemble des métabolites excrétés n'ayant probablement pas un rôle cytotoxique. Ainsi d'autres paramètres semblent être plus à même d'expliquer la diversité entre les souches. Cette approche permet néanmoins de faire ressortir des métabolites qui pourraient être responsables de cette cytotoxicité. Un des métabolites les plus surexprimés par les souches identifiées comme cytotoxique est l'homocystéine (p-value < 0.01) (Figure 87). En plus de la toxicité de cette molécule mise en évidence chez l'homme, différentes études ont décrit la cytotoxicité de l'homocystéine sur des cellules neuronales, rénales ou hépatiques²⁶⁸⁻²⁷². Celle-ci serait médiée par une méthylation de l'ADN ou l'induction d'un stress oxydatif et serait dépendante de la présence en glutathion^{270,272,273}. Parmi les métabolites surexprimés, on retrouve également l'acide oxoadipique. L'accumulation de ce métabolite inhibe la chaîne respiratoire mitochondriale, et peut entraîner l'apoptose des cellules en présence d'acide quinoléinique, également produit par Pa^{274,275}.

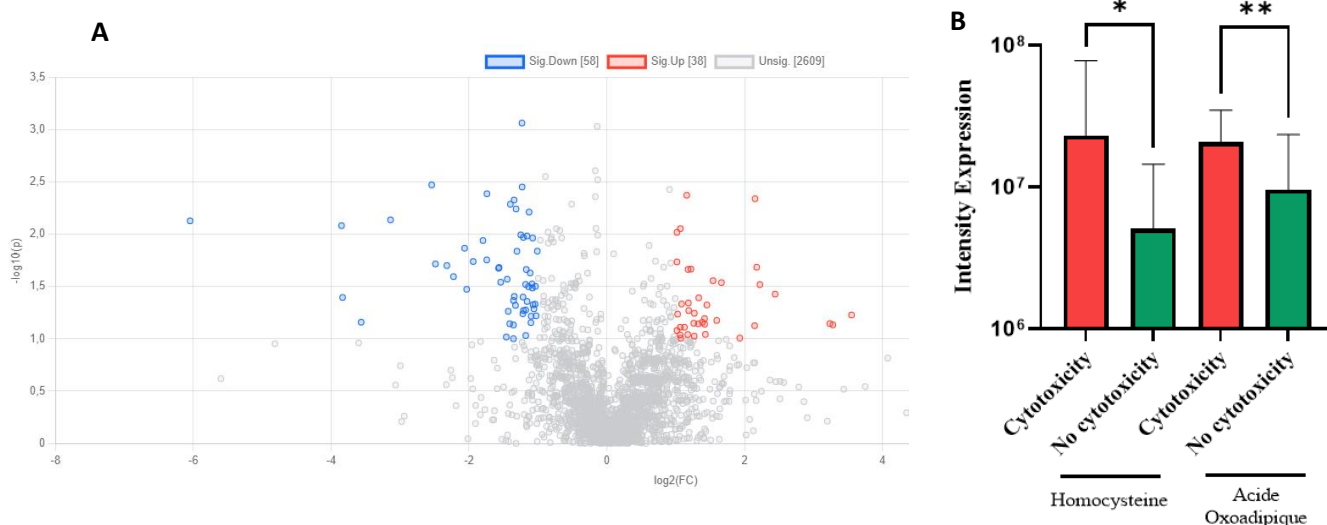


Figure 87 – Métabolites candidats impliqués dans la cytotoxicité des exométabolomes des souches. Volcano plot des métabolites différemment exprimés entre les deux groupes, avec représentés en rouge les métabolites surexprimés par les souches cytotoxiques (A). Représentation de la surexpression de l'homocystéine et de l'acide Oxoadipique par les souches cytotoxiques (B) (* : p-value < 0.05, ** p-value < 0.01).

Enfin, nous avons pu observer la surexpression par les souches cytotoxiques de deux métabolites appartenant à la voie du métabolisme des acides et dérivés cyano-aminés, représentés dans les encadrés orange sur la figure 87. Le cyanure d'hydrogène ayant une masse de 27,028g/mol n'est pas détectable sur l'intervalle sélectionné pour l'analyse. Il a été décrit que Pa était capable de synthétiser du cyanure d'hydrogène qui agit comme un inhibiteur de la respiration cellulaire. Il est produit en quantité suffisante par Pa pour pouvoir être dosé dans les expectorats de patients atteints de mucoviscidose et sa présence a été associée à une fonction respiratoire abaissée²⁷⁶. La cytotoxicité vis-à-vis des CD pourrait également concerner d'autres types cellulaires entraînant un déclin des fonctions respiratoires.

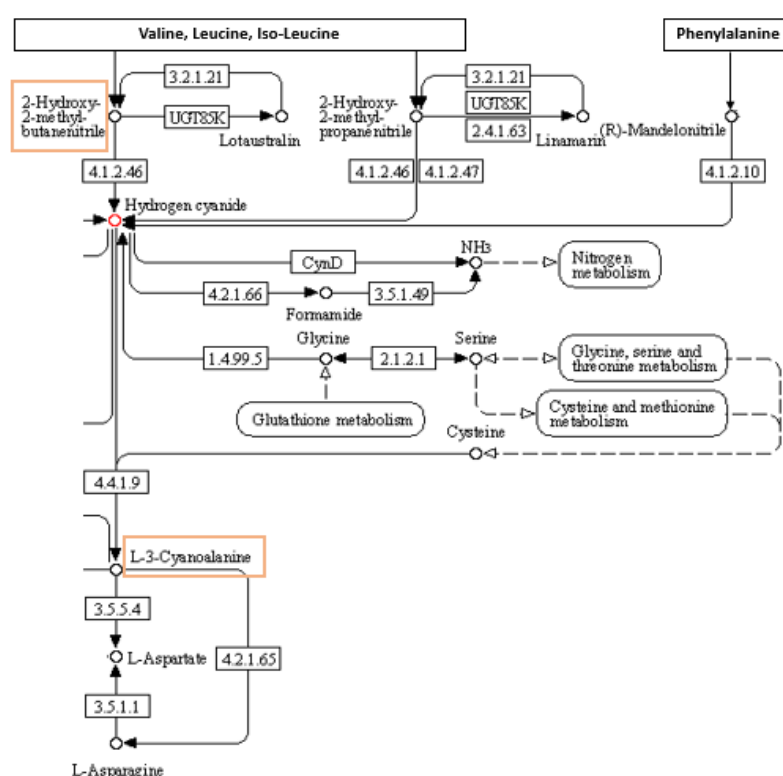


Figure 88 - Représentation de la voie métabolique du cyanure d'hydrogène chez Pa. Celui-ci est représenté en rouge sur la figure. Dans les encadrés orange sont identifiés les deux métabolites retrouvés comme surexprimés par les souches cytotoxiques, la cyanure d'hydrogène lui-même ne peut pas être identifié car de poids moléculaire trop faible (voie métabolique adaptée à partir de la base de données KEGG).

En perspective, une étude plus complète sur cet aspect sera réalisée et les résultats seront confirmés par l'évaluation de la mortalité cellulaire induite en présence des métabolites purifiés sur des cultures de CD.

En conclusion, nous avons développé une méthode d'analyse de l'exométabolome de souches bactériennes par métabolomique en LC-MS/MS, sur deux colonnes C18 et HILIC. Nous avons également mis au point un workflow pour le pré-processing des données par MZmine et comparé notre approche avec les résultats obtenus par R. Les données ont ensuite été validées et filtrées pour obtenir des données de bonne qualité. Afin d'étudier l'exométabolome des souches, nous avons normalisé l'expression des features par leur expression dans le milieu de culture, ceci nous a permis de nous affranchir du SCFM et de faire ressortir les métabolites excrétés par les souches. Nous avons également réalisé l'acquisition des différents constituants du milieu de culture de manière purifié pour déterminer leur rapport m/z et leur temps de rétention, nous permettant d'identifier un certain nombre de métabolites. L'annotation des métabolites a également été réalisée à l'aide de GNPS ou Sirius, de banque de données publiques telles que KEGG ou PAMDB, ou pour les features sans identification, la génération de réseau moléculaire avec Cytoscape.

Les données générées ont fait l'objet d'analyses statistiques non supervisées permettant de mettre en évidence deux clusters de souches en phase exponentielle et trois clusters de souches en phase stationnaire. Il est intéressant de noter que nous avons identifié le même nombre d'immunotypes pour chaque phase de croissance par le test immunologique *in vitro*.

Des analyses supervisées ont ensuite été conduites pour évaluer si nous pouvions différencier les exométabolomes, au cours des différentes phases de croissance, des isolats précoces et tardifs et des souches ayant des phénotypes de virulence distincts. Nous avons pu montrer que nous étions capables de les distinguer les exométabolomes des deux phases de croissance. Ceci nous a permis d'objectiver les différences que nous avons observées au cours du choix de la phase de croissance pour l'évaluation des immunométabolites. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de convergence d'évolution des isolats Tardifs par rapport aux isolats Précoces, signés par un exométabolome similaire. Enfin, aucune corrélation n'a pu être identifiée non plus entre le phénotype de virulence des souches et les différents clusters obtenus par métabolomique.

Une surmortalité des CD induite par l'exométabolome de certaines souches avait cependant pu être observée. Une analyse supervisée a été réalisée sur ce paramètre et nous avons pu montrer l'implication de la voie métabolique des dérivés cyano-aminés, dont les métabolites sont retrouvés dans les expectorats de patients atteints de mucoviscidose et dont l'expression est corrélée à une fonction respiratoire abaissée. Une surexpression de l'homocystéine, métabolite déjà connu pour ses propriétés cytotoxiques, de l'acide oxoadipique ou du cyanure d'hydrogène. Ces résultats n'ont toutefois pas été investigués sur des CD et il sera intéressant d'évaluer leur potentiel cytotoxique de façon purifié sur des cultures cellulaires *in vitro*.

Chapitre IV : Impact de l'exométabolome dans la régulation de l'immunité : mise en évidence d'immunométabolites bactériens.

Dans les chapitres précédents nous avons caractérisé les SN des souches d'un point de vue immunologique et métabolomique. Nous avons pu mettre en évidence que les métabolites excrétés présentaient différentes propriétés immunomodulatrices avec des souches immunosuppressives ou immunostimulantes. Ces propriétés mises en évidence *in vitro*, ont été validées dans un modèle murin de challenge infectieux, montrant notamment que les souches avaient la capacité de moduler la réponse immunitaire médiée par les Th17. D'autre part, nous avons pu observer que les souches présentaient différentes empreintes métaboliques et donc différents types d'exométabolome. Dans ce chapitre nous chercherons à identifier les métabolites qui pourraient être responsables des immunomodulations observées. Les immunométabolites candidats identifiés seront validés *in vitro* sur le phénotype de la CD (par le test immunologique *in vitro* mis au point) mais aussi sur la polarisation T subséquente (sur le modèle de co-culture allogénique de BMDC et de LT CD4 naïfs). Nous allons également investiguer *in vivo* si l'administration d'un métabolite immunomodulateur ou d'exométabolome de souches pouvait « contrebalancer » l'immunité induite par une souche aux propriétés immunomodulatrices opposées, au cours d'un challenge infectieux.

I. Corrélation des résultats obtenus lors des caractérisations immunologiques et métabolomiques pour l'identification de potentiels immunométabolites

1. Approches non supervisées pour l'évaluation du lien entre l'exométabolome et les propriétés immunomodulatrices des souches

Les analyses non supervisées de type ACP ont permis de mettre en évidence une séparation forte entre les échantillons avec 23% de séparation sur la première composante et de 11% pour la deuxième (Figure 89 A). Pour rappel, une séparation satisfaisante des groupes est mise en évidence à partir de 20% sur une des composantes. Ces résultats ont été complétés par une représentation en heatmap non supervisée et générée sur l'ensemble des features de la table. Les souches sont séparées par CAH, ce qui nous permet d'observer la distribution des échantillons. Cette représentation génère la même séparation marquée entre les isolats immunostimulants et immunosuppresseurs que celle observée en ACP : les souches immunosuppressives sont spontanément regroupées sur un des bras de la heatmap (carte de chaleur en français) et les souches immunostimulantes sont en majorité sur l'autre bras (Figure 89 B). Nous observons par la visualisation de l'expression des métabolites, une empreinte métabolique différente entre les deux bras de la heatmap et donc en fonction du type de souches. Ces résultats mettent en évidence que l'exométabolome, et donc peut être le métabolisme global de la souche, sont impliqués dans cette immunomodulation.

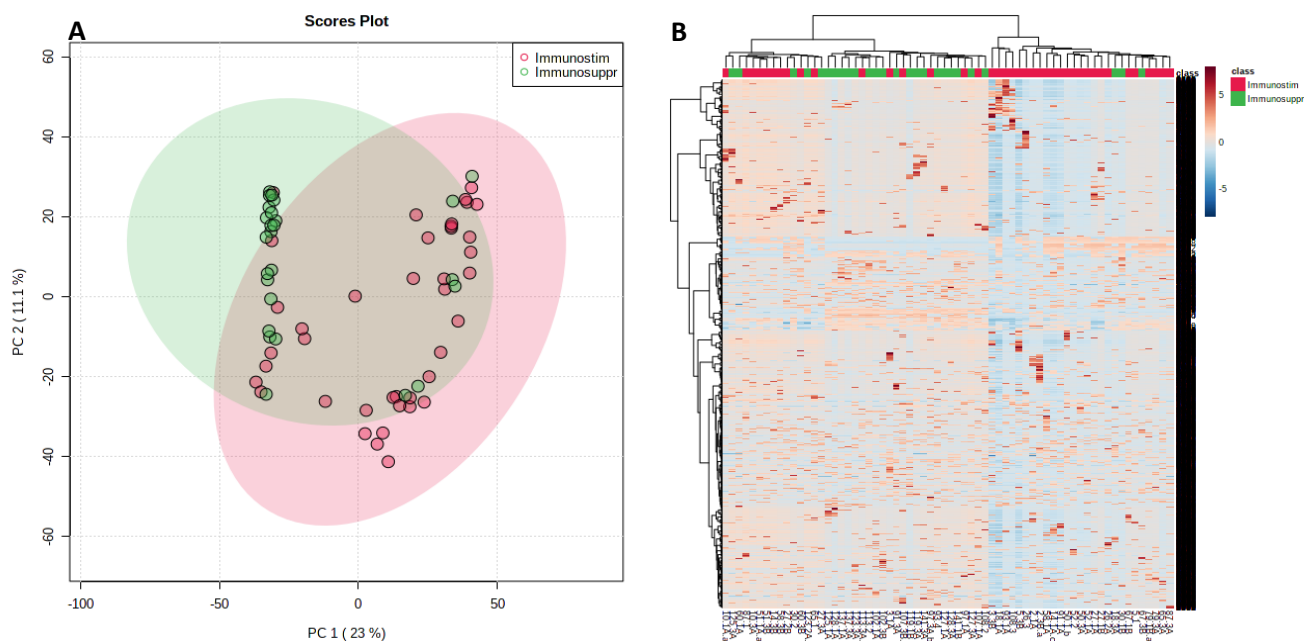


Figure 89 – Analyses non supervisées des exométabolomes des souches en fonction des propriétés immunomodulatrices. Représentation ACP des 66 souches sur les données de métabolomiques normalisées par l'expression des métabolites présents dans le SCFM (A). Heatmap représentant la répartition des souches de la banque, en fonction de l'expression de l'ensemble des feature (B)

Ces observations ont été complétées par un clustering des souches confirmant la séparation des souches en fonction de leurs propriétés immunomodulatrices, la majorité des souches immunostimulantes sont retrouvées dans le cluster 2, tandis que les souches immunosuppressives sont principalement identifiées dans le cluster 1 (Figure 90).

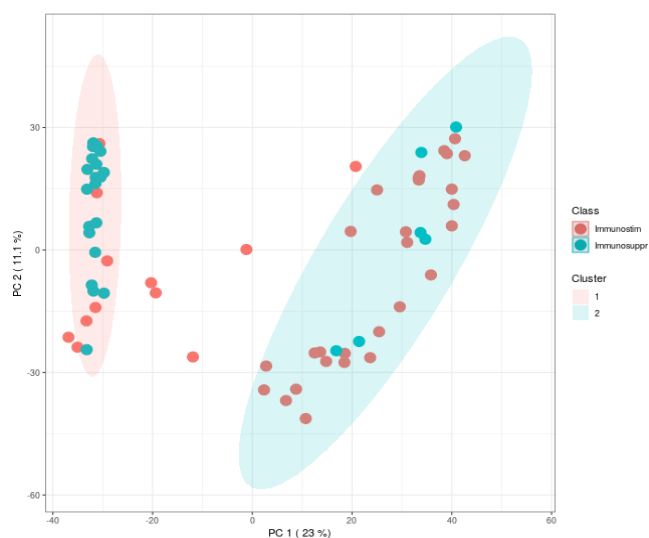


Figure 90 : Clusterisation des exométabolomes des souches et comparaison avec les caractéristiques immunologiques. Deux clusters de souches ont été constitués, le premier cluster regroupe principalement des souches immunosuppressives et le deuxième cluster des souches immunostimulantes (algorithme des Kmeans)

Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'il y avait une association statistiquement significative entre l'appartenance au cluster métabolique 1 et les souches immunosuppressives, et entre le cluster métabolique 2 et les souches immunostimulantes (Figure 91). Ceci souligne l'implication d'un ensemble de métabolites excrétés par les souches mais peut être également de leur métabolisme global pour conduire aux immunomodulations identifiées.

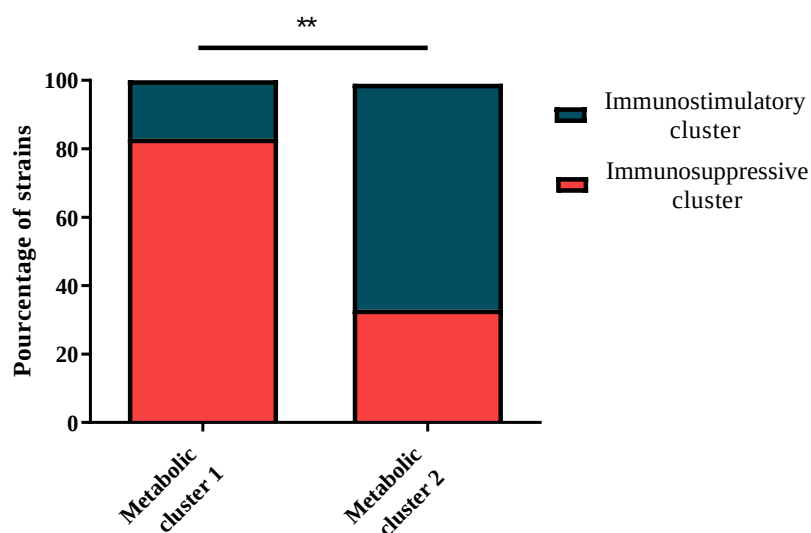


Figure 91 - Répartition des souches aux propriétés immunomodulatrices différentes en fonction des clusters métaboliques. Comme observé précédemment, les souches immunostimulantes sont retrouvées dans le cluster 1 tandis que les souches immunosuppressives appartiennent majoritairement au cluster 2 (** p-value < 0.01)

Les analyses non supervisées ont montré que l'utilisation de l'ensemble des métabolites permet de différencier les souches en fonction de leurs propriétés immunomodulatrices. Cela met en évidence une empreinte métabolique spécifique de chaque type de souche. Pour valider l'empreinte métabolomique en tant que biomarqueur en lui-même, une courbe ROC a été générée. La valeur de l'aire sous la courbe (AUC ou Area Under Curve) permet d'évaluer la qualité de l'empreinte métabolique en tant que biomarqueur permettant de différencier les souches²⁷⁷. L'AUC d'un biomarqueur intéressant est identifié à partir d'un score de 0,7²⁷⁷. Dans ce modèle L'AUC est de 0,86 (IC [0,7-0,96]), avec une p-value significative inférieur à 0,01 (Figure 92). Cette approche permet d'évaluer les propriétés immunomodulatrices des souches sur leur empreinte métabolique, directement après croissance, ce qui pourrait permettre d'adapter de façon précoce les traitements vis-à-vis des souches immunosuppressives, identifiées comme plus délétères pour le patient.

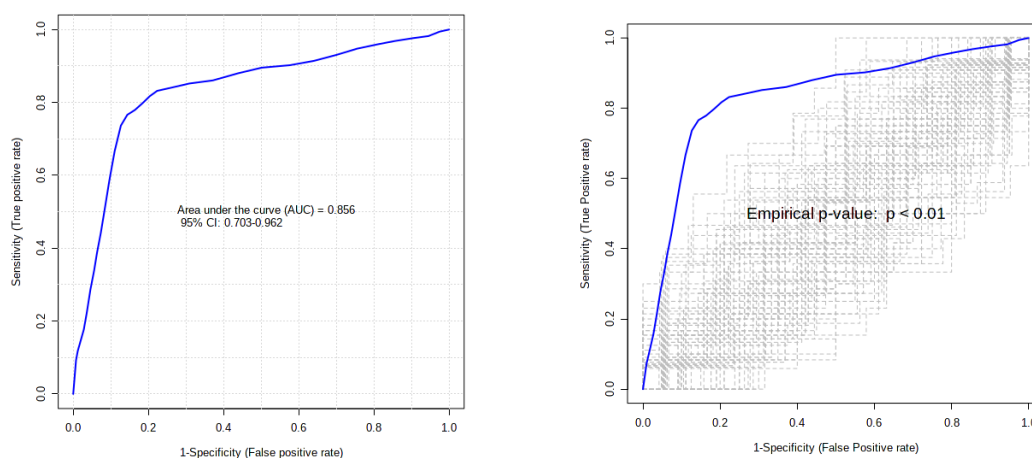


Figure 92 - Représentation de la courbe ROC de l'empreinte métabolique des souches en fonction de leurs propriétés immunomodulatrices (gauche). L'AUC de la courbe est de 0.86, mettant en évidence une signature métabolique d'intérêt. La significativité de cette analyse est représentée à droite.

2. Implication du métabolisme et de l'endométabolome dans les immunomodulations observées

Nous venons de montrer que l'empreinte métabolique globale de l'exométabolome des souches permet de distinguer les souches immunostimulantes et immunosuppressives. Ceci suggère une implication du métabolisme de la souche dans ces interactions avec le système immunitaire. Pour pouvoir valider cette hypothèse, le lien entre les propriétés immunomodulatrices des souches et l'endométabolome des souches a été évalué. L'endométabolome des souches de la banque a été caractérisé au cours de précédents travaux³³. Différents clusters, dénommés « métabotypes » ont été générés. En analysant les clusters constitués sur l'ensemble des métabolites de l'endométabolome (3090 variables). Deux analyses ont été réalisées : avec les 3 métabotypes ou 2 métabotypes, en associant les clusters 1 et 2 présentant une origine commune représenté sur la CAH de la figure 93. Dans les deux cas, nous avons pu mettre en évidence une corrélation statistiquement significative entre les métabotypes et les propriétés immunomodulatrices des souches : immunostimulantes ou immunosuppressives (p-value = 0.03 et 0.02 respectivement, test exact de Fisher). Ce résultat permet de mettre en évidence l'implication du métabolisme global de la souche dans la génération des métabolites excrétés et dans l'interaction avec son environnement.

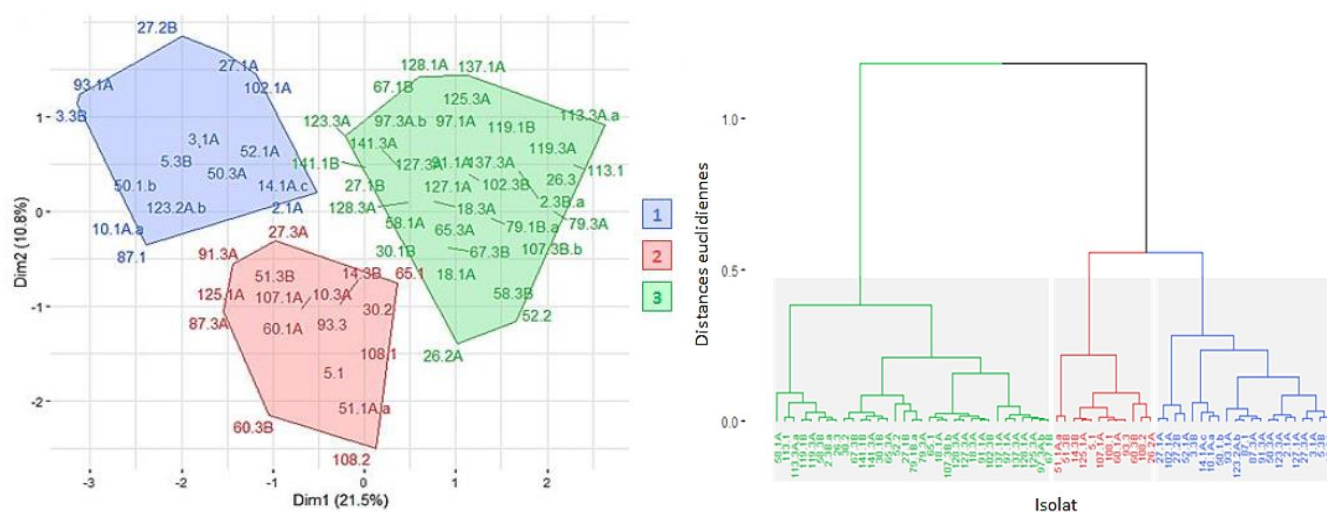


Figure 93 - Clusterisation HCPC des isolats de la banque sur les données d'endométabolome (3090 variables, thèse d'O. Moyne). Trois clusters ont été identifiés, la représentation en dendrogramme montre une plus grande proximité entre les clusters 1 et 2.

3. Corrélation exométabolome et transcriptome

Le transcriptome représente l'ensemble des ARN présents dans une cellule à un instant donné comprenant les ARNm (messager), les ARNr (ribosomaux), les ARNt (ARN de transfert) et les ARNnc (non codant). Il permet de faire le lien entre le génome et le métabolome. La technique utilisée pour cette analyse est le RNAseq qui permet d'étudier tous les gènes sans a priori. Un séquençage de 11 souches de la banque a été réalisé par Razak Tidjani, post doctorant au sein du

laboratoire. Avant le séquençage une déplétion des ARN ribosomaux a été effectuée à l'aide du Kit RiboMinus™ de ThermoFisher. L'expérience a été réalisée en triplicat.

Les résultats obtenus par RNAseq donnent une information sur les gènes exprimés pouvant être impliqués dans la production des métabolites immunomodulateurs. L'empreinte globale est évaluée de façon non supervisée, puis une analyse ciblée sur les voies métaboliques identifiées a été réalisée et viendra compléter les résultats obtenus par métabolomique. Une analyse ACP réalisée sur les données de transcriptomique a permis de montrer que les souches se séparaient en fonction des immunotypes auxquels elles appartenaient (figure 94). Ces résultats sont confirmés avec la représentation en dendrogramme de la figure 95, montrant qu'à l'exception de la souche numéro 2, celles-ci sont classées en fonction des propriétés immunomodulatrices identifiées.

L'appartenance respective aux différents groupes est représentée sur la figure 96, soulignant le lien entre les résultats obtenus par transcriptomique et les propriétés immunomodulatrices des souches médiées par l'exométabolome.

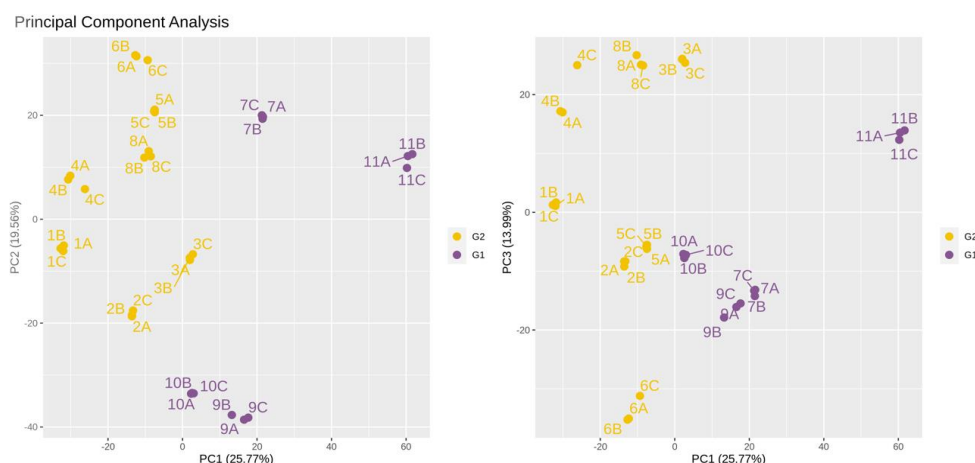


Figure 94 - Représentation ACP des données de transcriptomique et appartenance aux immunotypes (G1 : cluster Immunosuppresseur en violet et G2 : cluster Immunostimulant en jaune). Les souches sont spontanément regroupées en fonction de leurs propriétés immunomodulatrices sur les données de transcriptomique.

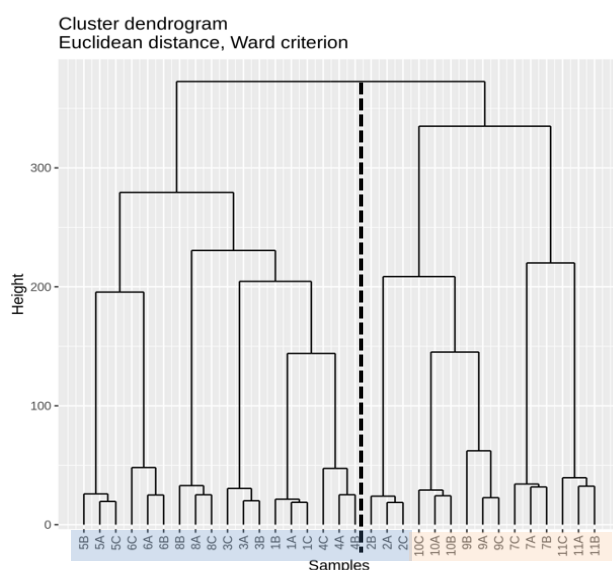


Figure 95 :
CAH des souches obtenues sur les données de transcriptomique.
L'appartenance aux clusters immunologiques est représentée en bleu pour les souches immunostimulantes et en rouge pour les souches immunosuppressives. Cette deuxième représentation vient confirmer les résultats obtenus en ACP.

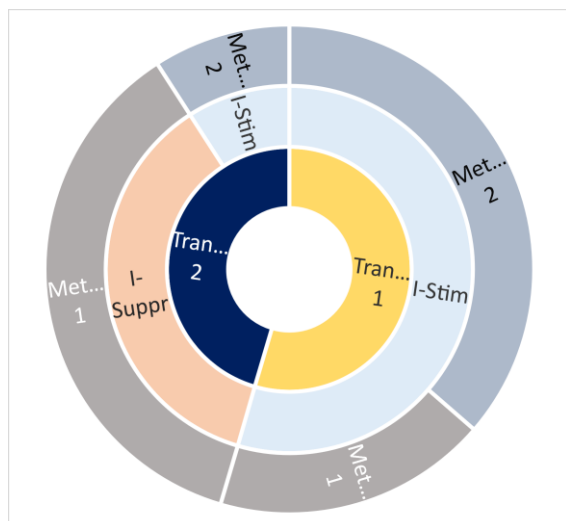


Figure 96 :

Diagramme en soleil permettant de prendre en compte l'appartenance des souches aux 3 types de caractérisations effectuées au préalable.

Le nombre de souche est représenté par l'importance de chaque partie du diagramme. Les souches sont d'abord classifiées en partant du centre du cercle, selon leur appartenance aux clusters définis par transcriptomique, puis sur les propriétés immunologiques et enfin sur les clusters de métabolomique

4. Approches supervisées pour l'identification des métabolites immunomodulateurs

➤ 4.1. Identification de métabolites immunostimulants ou immunosuppresseurs

Des analyses supervisées ont été conduites afin d'identifier les métabolites qui pourraient être responsables des immunomodulations observées. Deux types d'analyses statistiques ont été réalisées : une analyse PLS-DA et un t-test. La représentation PLS-DA est basée sur l'analyse d'un certain nombre de métabolites dont l'expression est significativement augmentée ou diminuée entre les groupes. Cela génère une liste de « VIP » identifiés par un score supérieur à 2. Sur la figure 97A, sont représentés les 30 premiers métabolites d'intérêts. En tout 175 features présentaient un score supérieur à 2 et sont donc significativement modulés entre les souches immunosuppressives ou immunostimulantes. La séparation obtenue par chromatographie C18 a été confirmée sur les données en HILIC et a permis de générer également une liste de features d'intérêts, qui dans la majorité des cas était redondante (Fig 97B).

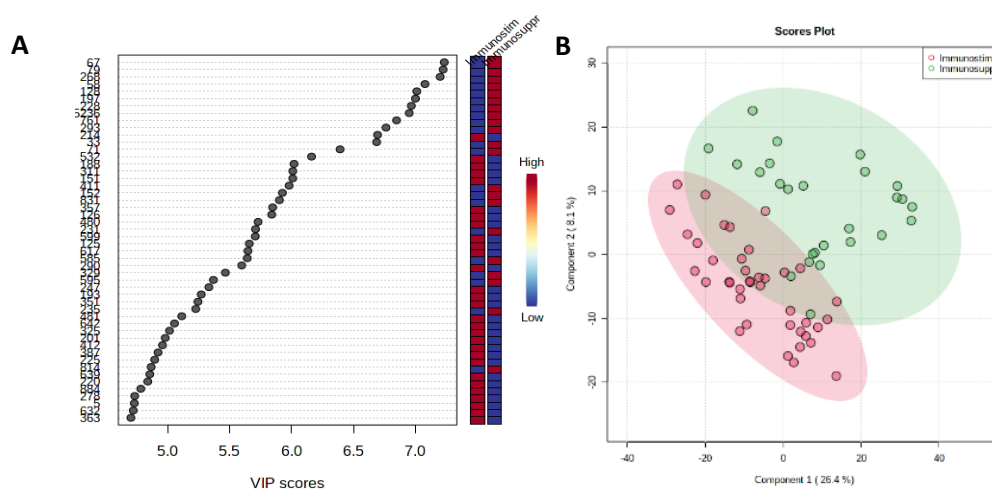


Figure 97 – Les métabolites dont les concentrations diffèrent significativement entre les groupes sont identifiés par une analyse supervisée de type PLS-DA et sont considérés comme d'intérêt lorsque leur score est supérieur à 2 (A). Analyse supervisée sur les données obtenues sur colonne de chromatographie HILIC montrant également une séparation marquée (B).

Une deuxième approche supervisée par un t-test (ANOVA pour deux groupes) nous a permis de compléter l'identification des métabolites immunomodulateurs candidats. Cette analyse génère un Volcano-Plot permettant d'identifier les métabolites surexprimés ou sous exprimés dans chaque groupes (Figure 98). Au total 220 métabolites ont été mis en évidence par cette approche, et 118 étaient surexprimés par les souches immunosuppressives.

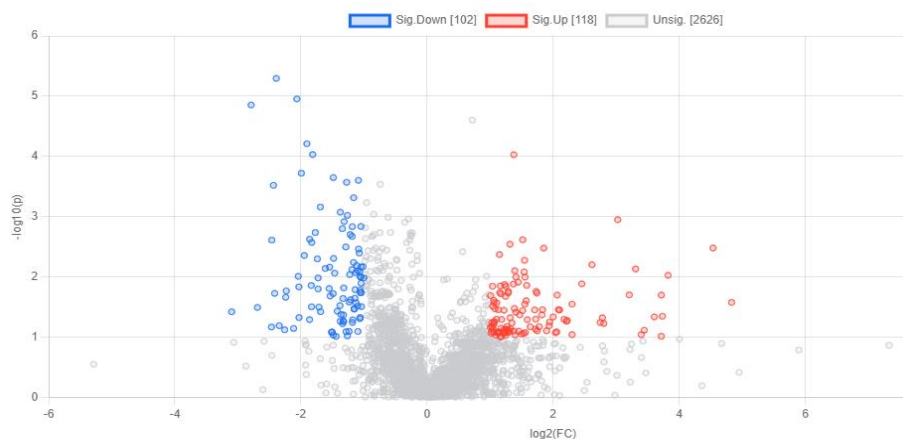


Figure 98 - Identification des features discriminants les deux types de souches immunostimulantes ou immunosuppressives par un t-test, représenté en volcanoplot. Les métabolites représentés en bleu sont surexprimés par les souches immunosuppressives et ceux représentés en rouge sont surexprimés par les souches immunostimulantes.

L'expression par les souches, des 50 métabolites d'intérêt identifiés par les approches PLS-DA et t-test, est représentée sur les heatmap de la Figure 99A et B respectivement. Ces deux analyses nous ont permis de générer une liste de features d'intérêt, présentées sur le tableau XVII. Les métabolites discriminants ont été identifiés par les différentes approches présentées précédemment, à savoir l'utilisation des bases de données et notamment de KEGG et PAMDB, les identifications fournies par GNPS et Sirius et enfin l'utilisation de réseaux moléculaires générés par Cytoscape.

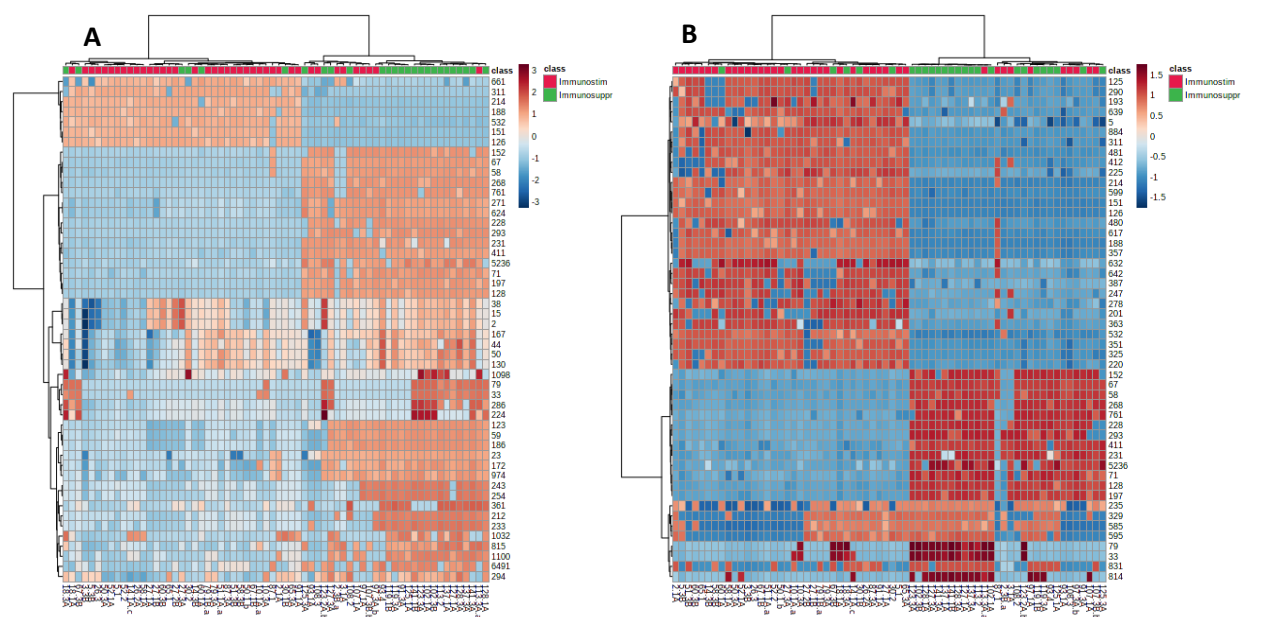


Figure 99 - Heatmap permettant de confirmer les métabolites d'intérêt préalablement identifiés par PLS-DA (A) et t-test (B), et d'apprécier leurs concentrations respectives.

Les métabolites identifiés comme sur ou sous-exprimés par les souches aux propriétés immunomodulatrices distinctes sont listés dans la tableau XVII et pour chaque métabolite est présenté le rapport m/z, le temps de rétention, la valeur de la p-value obtenue par le t-test et le « fold change » (correspondant à la différence d'expression entre les groupes), les valeurs positives sont associées à un métabolite surexprimé par les souches immunostimulantes. Les métabolites ont également été replacés dans les voies métaboliques permettant leur synthèse, représentés sur la figure 100. Les voies métaboliques telles qu'elles sont décrites sur le schéma sont issues de la banque de données KEGG, basée sur le génome de PAO1. Cette représentation a été complétée avec les données de transcriptomique dont nous disposons, en utilisant la base de données Pseudomonas Genome DB et Uniprot pour les identifications. Ceci permet de venir appuyer les observations effectuées en métabolique, dans une approche « multi-omique ».

Les voies métaboliques utilisées par les deux types de souches sont représentées en orange pour les souches immunosuppressives et bleu pour les souches immunostimulantes. Il s'agit principalement de la voie métabolique de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane pour les souches immunosuppressives puisque ces acides aminés ont été plus fortement consommés. Une consommation moins importante des glucides présents dans le milieu a également été mise en évidence. A l'inverse, les souches immunostimulantes utilisent majoritairement les voies médiées par la méthionine, la proline ou l'alanine, acides aminés plus fortement consommés également. Ces différentes voies se croisent au niveau de l'axe Shikimate – Chorismate, axe central dans le métabolisme des souches.

Tableau XVII – Liste des métabolites identifiés et valeur statistique

m/z	RT	ID	p-value	Log2(FC)	m/z	RT	ID	p-value	Log2(FC)
132.102	2.18	Méthionine	0.001583	-1.0387	166.086	5.21	Phenylalanine	0.012195	1.7078
359.130	1.58	MOPS	4.8106E-7	-2.5936	182.081	2.59	Tyrosine	0.0031013	1.0589
128.107	0.72	Prenol	4.8021E-6	2.686	169.095	0.88	Lysine	0.015432	1.6426
248.035	1.11	Dérivé MOPS	7.8552E-7	-2.1119	116.071	1.09	Proline	0.0010366	5.3284
197.04	0.8	Shikimic acid	1.7663E-6	-2.5821	151.058	1.59	UHQ	3.2063e-05	1.1217
159.091	6.67	Indole	0.046627	-2.05	409.186	6.67	Gly-Phe-Trp	1.2691e-05	-2.382
211.078	1.13	« ose »	1.8344E-7	-2.2739	90.055	0.95	Alanine	0.035816	-6.2724
479.187	5.98	N-acetyl-β-D-glucosamine-1,6-anhydro-N-acetyl-β-D-muramate	6.3967e-05	1.8666	87.044	2.9	N-Succinyl-LL-2,6-diaminoheptanedioate	0.08	-3.5513
341.173	2.02	Ubiquinone-2	0.0080651	-2.137	152.056	1.54	Guanine	0.0047156	-1.9467
169.045	0.8	2-Aceto-2-hydroxy-butyrate	5.402E-7	-2.4311	153.040	2.46	Xanthine	0.01118	-1.895
409.186	6.67	Peptide	0.030805	-2.3337	274.274	11.89	Sphinganine	4.2841e-05	-1.823
275.135	1.88	N2-Succinyl-L-arginine	0.0022515	-2.0105	252.108	7.81	Muramate	0.0164	1.3975
132.08	6.67	3-Methylindole	1.9004e-05	-2.5757	352.067	12.31	Pyocheline	0.0001128	3.025
404.206	12.8	Acid Sinaptic	2.6341e-05	-1.3237	162.998	1.82	Succinate	0.00011433	1.7501
123.04	0.80	Carbamate	9.6491E-7	-2.4073	216.088	6.17	Glutathion	1.4643e-06	1.4436
341.174	2.23	Ubiquinone-2	0.0024922	-2.023	225.065	11,57	Phenazine	0.0046935	4.9713
176.184	5.6	Indole-3-acetic acid	4.4493e-05	-2.1525	211.086	6.71	Pyocyanine	0.007589	6.3763
146.060	6.67	Indole-3-carboxaldehyde	4.4493e-05	-2.1525	274.180	4.52	HQNO	0.028493	2.3022
120065	2.58	2-Dehydropantoate	0.01028	-2.1045	239.966	0.8	7-Cyano-7-carbaguanine	0.0065897	1.2373
212.083	1.32	6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin	4.1693E-5	-5.7202	182.985	0.03	5-enolpyruvyl-shikimate 3-phosphate	1.8865E-5	0.93412
105.042	0.87	3-cyanopyridine	6.4029E-5	-1.7604	135.027	1.59	S-Adenosylhomocysteine	2.3425e-05	1.2513
98.98	1.27	Acetate	5.3396e-05	-1.6739	244.079	1.07	N-acetyl-D-glucosamine	0.02	-2.2185
191.121	5.29	Homoserine	4.945e-05	-2.3086	190.993	6.7	2-Oxoglutarate	0.0637	-1.5833

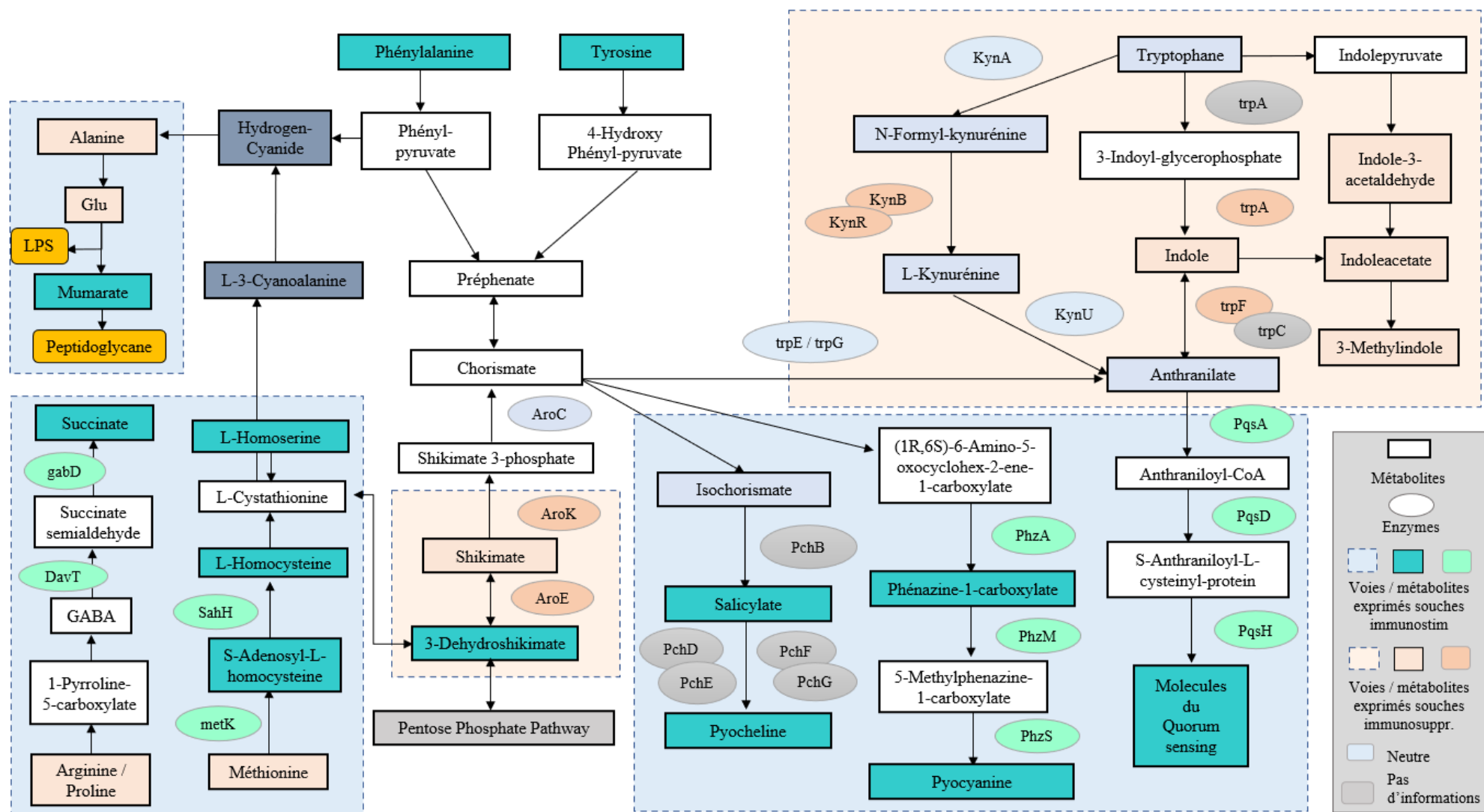


Figure 100 - Représentation des métabolites et enzymes surexprimés par les souches appartenant aux différents immunoclusters identifiés par analyses supervisées. (La légende est présentée dans le cadre gris à droite du schéma)

➤ 4.2. Métabolites immunosuppresseurs

Les métabolites les plus discriminants, produits par les souches immunosuppressives, sont l'indole et ses dérivés : 3-Methylindole, Indole-3-acetic acid, Indole-3-acetaldehyde. La capacité de Pa à métaboliser le tryptophane en indole et autres molécules apparentées a été moins étudiée. En effet, la métabolisation du tryptophane est majoritairement orientée vers la production de Kynurénine puis d'Anthranilate. Sur 12 souches produisant des pigments, Stanier RY. et son équipe ont été capables d'identifier une souche métabolisant le tryptophane en indole²⁷⁸. Différentes voies ont cependant été décrites à partir de la métabolisation du tryptophane ou issues de l'Anthranilate, représentées sur la figure 100. De nouvelles voies de biosynthèse de précurseurs, tels que l'indole-3-glycerol phosphate, ont également été mises en évidence, non médiées par trpC, pouvant suggérer que la génération de l'indole et ses dérivés est encore mal caractérisée²⁷⁹. D'autres métabolites ont également été mis en évidence comme le Shikimate, intermédiaire métabolique central chez Pa. Le N2-Succinyl-L-arginine est également surexprimé, il est issu de la métabolisation de l'arginine par les enzymes aruF et aruG, dont l'expression est augmentée chez les souches immunosuppressives, mais de façon non significative (p-value = 0,07). Il est intéressant de noter que la voie de métabolisation opposée mène à la synthèse de la putrescine et de la spermidine, métabolites de la voie des polyamines déjà mis en évidence comme impliqués dans la virulence des souches³³.

➤ 4.3. Métabolites immunostimulants

Les métabolites les plus fortement exprimés par les souches immunostimulantes sont issus de la métabolisation du Chorismate vers 3 voies non utilisées par les souches immunosuppressives. Ces trois voies sont impliquées dans la production de facteurs de virulence de PA. Tout d'abord, une surexpression des molécules du quorum sensing a été observée. Celle-ci est médiée par l'Anthranilate, les enzymes PqsA, PqsD et PqsH étant surexprimées. Les sidérophores sont également surexprimés, il s'agit de la Pyocheline et de la Pyocyanine ainsi que de leurs précurseurs respectif, le Salicylate et la Phénazine-1-carboxylate. Les enzymes qui permettent la synthèse de la Pyocyanine, PhzA PhzM et PhS, sont également surexprimés. Les données de transcriptomique concernant l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de la Pyocheline n'étaient pas disponibles. De la même façon, nous n'avons pas réussi à identifier la Pyoverdine dans les données de métabolomique, la molécule purifiée sera utilisée pour l'identifier. D'autres métabolites ont également été mis en évidence tels que les métabolites issus de la métabolisation de la méthionine que nous avons déjà observés comme surproduits par les souches cytotoxiques tels que l'homocystéine. Enfin, une surexpression du succinate a également été observée, issue de la métabolisation du GABA par une surexpression des enzyme DavT et gabD. Le mumarate, précurseur de la synthèse du peptidoglycane, a également été retrouvé ainsi que le glutathion.

➤ 4.4. Identification de métabolites modulant l'expression du PD-L2

Une seconde analyse supervisée a été réalisée sur deux clusters immunostimulants PD-L2^{high} et PD-L2^{Low} afin d'identifier les métabolites responsables de la modulation de l'expression du PD-L2 à la surface des CD. Il est intéressant de noter que malgré un exométabolome relativement similaire entre les souches immunostimulantes, une séparation marquée de deux types de souches par PLS-DA a été observée, avec un score de 20% pour la première composante (Figure 101A). Les métabolites candidats identifiés par PLS-DA sont représentés sur la figure 101 B et correspondent à ceux identifiés par le volcanoplot de la figure 102.

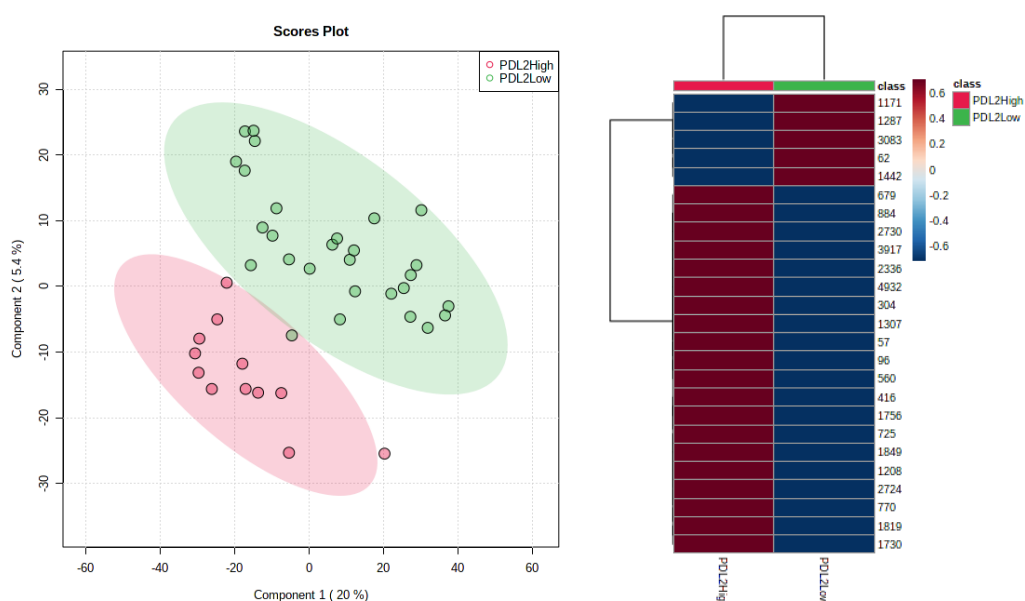


Figure 101 - Analyse par PLS-DA de l'exométabolome des souches, permettant de mettre en évidence une différence marquée entre les groupes induisant une expression variable du PD-L2 (A). Les métabolites à l'origine de la séparation sont représentés sur la heatmap (B). La majorité des métabolites sont surproduits par les souches immunostimulantes PD-L2^{High}

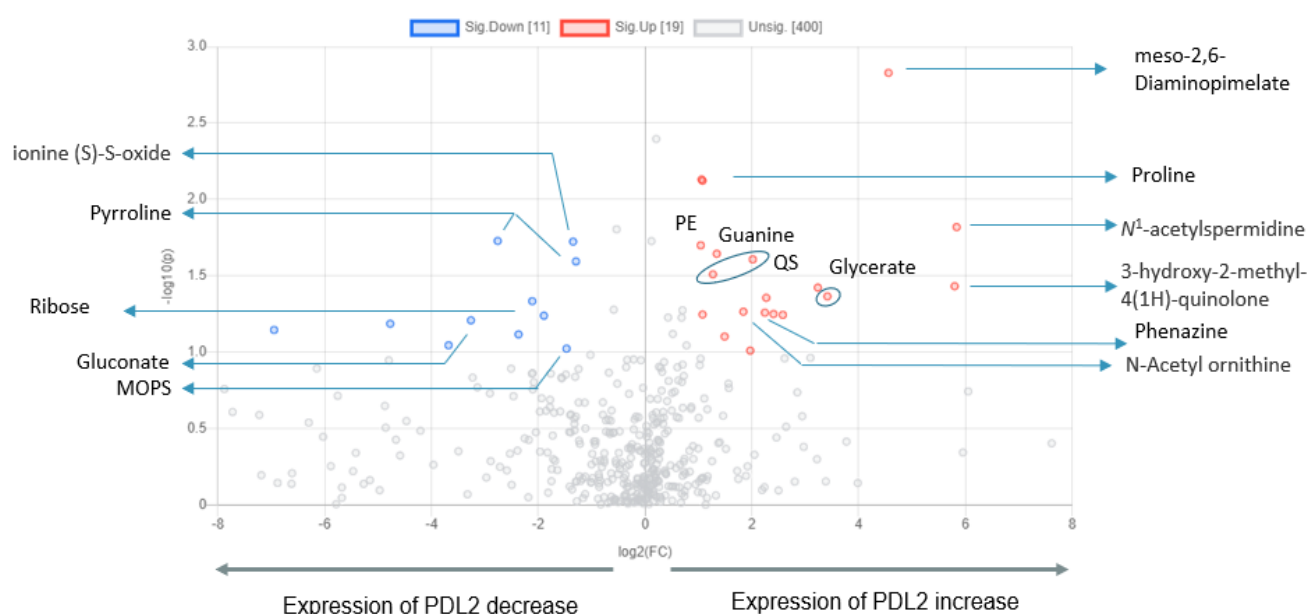


Figure 102 - Volcanoplot des métabolites pouvant moduler l'expression du PDL2 à la surface des CD.

Les métabolites qui pourraient être à l'origine de l'augmentation de l'expression du PD-L2 sont représentés sur la droite du Volcano Plot de la Figure 102. Nous avons pu mettre en évidence notamment une surexpression du meso2,6-diaminopimelate qui, comme le muramate identifié précédemment, est un précurseur de la synthèse du peptidoglycane. Une surexpression d'un des métabolites de la spermidine appartenant à la voie des polyamines, a également été identifiée. Enfin, nous retrouvons de nouveau la voie de biosynthèse de la Phénazine qui comprend les molécules du quorum sensing, mais avec des molécules différentes de celles identifiées comme surexprimées par les souches immunostimulantes.

➤ 4.5. Bilan et interprétation

▪ 4.5.1. Métabolites immunosuppresseurs, mise en contexte scientifique

Nous avons montré que les souches immunosuppressives produisent notamment de **l'indole et ses dérivés**. Ils sont connus pour leurs propriétés immunomodulatrices comme cela a été présenté dans la revue en introduction de cette thèse. L'indole et les dérivés identifiés tels que l'indole-3-aldehyde (I3A), l'indole-3-acetic acid (IAA) et le 3-methylindole sont des AhR ligands²⁸⁰. Les AhR sont impliqués dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Au niveau de la CD, ils induisent une expression d'IL-10 et inhibent la production de d'IL-1 β et d'IL-6²⁸¹. Ils sont également capables de moduler l'activation et la différenciation des LT. Ils ont notamment été décrits pour leur capacité à entraîner une polarisation du LT naïf vers un phénotype T régulateur, médié par l'induction du facteur de transcription FoxP3²⁸². Ils possèdent également un effet immunosuppresseur par l'augmentation de l'expression de l'IDO (indoléamine-2,3-dioxygénase) qui métabolise le tryptophane en Kynurénine. Cette métabolisation entraîne une déprivation en tryptophane responsable d'une anergie et d'une apoptose des LT²⁴. De plus, la Kynurénine oriente la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 et des LT vers un phénotype régulateur²⁴. Il est intéressant de noter que si certaines études ont montré que l'AhR jouait un rôle dans la différenciation des Th17, d'autres études ont montré que les ligand AhR avaient la capacité d'inhiber la polarisation des LT vers un phénotype Th17 que ce soit par une action directe ou indirecte médiée par les LT reg^{281,283,284}.

Il a également été montré que l'indole, au-delà de ses propriétés immunomodulatrices, était une molécule impliquée dans la communication inter-espèce²⁸⁵. La production d'indole et de certains dérivés par *E. Coli* entraîne une diminution de la virulence des souches de *Pa* en inhibant la synthèse des molécules du quorum sensing mais également des facteurs de virulence comme les sidérophores : la pyocyanine, la pyocheline et la pyoverdine²⁸⁶. Il est intéressant de noter que chez les souches immunosuppressives, ces voies sont inhibées par rapport aux souches immunostimulantes. Cependant, il a également été montré par Hu M. et son équipe que certaines

bactéries comme *E. coli* entéropathogène présentent une toxicité indirecte qui nécessite la présence du tryptophane et notamment de l'enzyme métabolisant le tryptophane en indole, la tryptophanase²⁸⁷. De même, il a été décrit que l'indole a la capacité d'augmenter l'antibiorésistance de *Pa* en induisant une augmentation de l'expression des gènes codant pour des pompes d'efflux²⁸⁶.

Enfin, l'indole agit également sur d'autres espèces bactériennes et fongiques²⁸⁵. Il a été mis en évidence sur *Sa* et sur *Candida albicans* que l'indole et ses dérivés diminuaient leur capacité à former un biofilm mais également qu'ils atténuaient leur virulence²⁸⁵. Ils inhibent par exemple la production de staphyloxanthine et d'hémolysine chez *Sa*, mais également la capacité de *Candida albicans* à filamenter. Ceci se traduisant par une diminution de la colonisation fongique. Ainsi la production de ce métabolite par les souches immunosuppressives pourrait être un moyen de lutter de façon simultanée contre le système immunitaire et contre les autres pathogènes, tels que nous avons pu l'observer pour les souches immunosuppressives.

Concernant les autres métabolites que nous avons pu identifier, peu de données ont été publiées sur les potentielles capacités immunomodulatrices du **Shikimate**. Cependant, Kelly Rabelo et son équipe ont mis en évidence que le Shikimate inhibait le relargage des cytokines telles que le TNF α et l'IL1 β , ainsi que du NO par les macrophages sous activation LPS²⁸⁸. D'autres études sont nécessaires pour compléter cette observation. De la même façon peu de données sont disponibles sur le lien entre le **N2-Succinyl-L-arginine** et l'immunité. Il s'agit cependant d'un métabolite de l'arginine. L'arginine ayant été décrite pour ces propriétés pro-inflammatoires, la diminution des concentrations dans le milieu extracellulaire pourrait être en faveur d'une immunosuppression²⁸⁹.

■ 4.5.2. Métabolites immunostimulants, mise en contexte scientifique :

Les souches immunostimulantes utilisent différentes voies métaboliques que celles utilisées par les souches immunosuppressives. La métabolisation du Chorismate est orientée vers la synthèse des facteurs de virulences tels que les sidérophores mais également vers la production des molécules du quorum sensing. D'autres métabolites ont également été retrouvés tels que le succinate ou le glutathion tous les deux impliqués dans la réponse au stress oxydant.

L'impact de la production des **sidérophores** sur l'immunité est assez peu décrite. Concernant la **pyocyanine**, il a été montré que ce pigment est capable d'induire une apoptose des PNN et par conséquent une diminution de la production de cytokines (IL-6 et IL-1 β) et de chimiokines, diminuant l'inflammation locale et permettant à la bactérie de persister chez l'hôte^{223,290}. De la même façon, une diminution de la production de NO, TNF α et IL-1 β par les macrophages traités par de la pyocyanine a été observée²⁹¹. Moura-Alves et son équipe ont également mis en évidence

que la pyocyanine pouvait être un ligand AhR. L'activation de ce récepteur permet la dégradation du sidérophore, mais surtout la régulation de la production de cytokines et chimiokine conduisant à un meilleur contrôle de l'infection²⁹². Cependant, la Pyocyanine a également été décrite pour ces propriétés pro-inflammatoires. Elle entraîne une augmentation de la production d'IL-8 et de l'ICAM-1 par la génération d'un stress oxydant^{293,294}. C'est également par ce mécanisme qu'est médiée l'apoptose des PNN²⁹⁰. Enfin la pyocyanine présente une toxicité dirigée contre d'autres bactéries comme *Sa* ou vis-à-vis des cellules épithéliales en inhibant la respiration cellulaire^{295,296}. Ceci a été validé *in vivo* dans des modèles murins d'infections à *Pa* montrant que les souches ne produisant pas de Pyocyanine présentaient une pathogénicité fortement diminuée²⁹⁷. L'ensemble de ces paramètres font de la pyocyanine un facteur de virulence majeur de *Pa*, néanmoins les résultats discordants ne nous permettent pas de conclure quant aux propriétés immunomodulatrices de ce pigment²⁹⁸. Parallèlement, il a été décrit que la phénazine, molécule apparentée au précurseur de la pyocyanine, permettait de diminuer le recrutement des lymphocytes et des macrophages en inhibant la production de CCL5 (Chemokine (C-C motif) ligand 5) et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) par les cellules épithéliales²⁹⁹.

Concernant la **pyocheline**, si des liens ont été faits entre son excrétion et la production de mucus, aucune publication n'a été faite sur le lien entre la pyocheline et l'immunité, il pourrait s'agir d'un nouveau métabolite immunomodulateur qui n'a pas encore été caractérisé à ce jour.

Enfin les molécules du **quorum sensing** ont également été mise en évidence comme ayant des propriétés immunomodulatrices, comme cela a été décrit dans la revue présentée dans le manuscrit et dans l'introduction. Brièvement, il a été montré que les molécules du quorum sensing peuvent impacter l'activité des cellules de l'immunité innée et adaptative et induire des réponses pro-inflammatoire notamment médiées par le relargage de ROS, TFN α et de prostaglandine.

La réponse de *Pa* au **succinate** produit par les cellules de l'hôte a été décrite (cf introduction), mais l'impact de ce métabolite produit par les souches elles-mêmes n'a pas été étudié d'un point de vue immunitaire. Il a été montré que chez les patients atteints de mucoviscidose, la production de succinate par les macrophages, était exacerbée entraînant une accumulation dans le microenvironnement. Ceci est responsable d'un stress oxydatif chez *Pa* dû à la production de ROS³⁰⁰. *Pa* est cependant capable de surexprimer des composants anti-oxydants afin de réduire la production interne des ROS, mais également de former un biofilm protecteur par la production d'alginate médiée par *algD*³⁰⁰. Il est intéressant de noter que les souches immunostimulantes expriment 5 fois plus *algD* que les souches immunosuppressive (p-value < 0.0001). Le même mécanisme pourrait ainsi être utilisé par les souches immunostimulantes pour induire un stress oxydant aux cellules immunitaires.

La surexpression du glutathion permet également de protéger la bactérie du stress oxydant. Michie K. et son équipe ont ainsi décrit que la croissance des souches ne produisant pas de glutathion était affectée *in vitro*, mais également que celles-ci étaient moins virulentes dans des modèles murins d'infection aigue à Pa³⁰¹. Il a également été montré que les bactéries déplétées de leurs capacités à produire le glutathion produisent moins de facteurs de virulence tels que la pyocyanine et la pyoverdine et présentent une mobilité réduite³⁰². Enfin, l'expression des molécules du quorum sensing tient compte en partie de l'état rédox de la cellule par l'intermédiaire des taux de glutathion³⁰³.

■ 4.5.3. Métabolites induisant une surexpression du PD-L2, mise en contexte scientifique

Pour finir, concernant les métabolites pouvant induire une surexpression du PD-L2, deux métabolites ont été mis en évidence : le meso2,6-diaminopimelate et la N-acétylspermidine. L'impact du meso2,6-diaminopimelate sur l'immunité n'a pas été décrit chez l'homme. Cependant il a été montré que ce constituant du peptidoglycane est reconnu par NOD-1 (Nucleotide-binding oligomerization domain proteins-1) à la surface des CPA, dont l'activation déclenche la voie de signalisation médiée par NF-κB et entraîne la sécrétion de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires^{304,305}. La N-acétylspermidine est issue de l'acétylation de la spermidine appartenant à la voie des polyamines. Si cette voie a été bien caractérisée quant à ses propriétés immunomodulatrices, le rôle de cette molécule plus particulièrement n'est pas décrit.

Afin d'investiguer ou confirmer ces résultats, les immunométabolites candidats que nous venons d'identifier seront évalués *in vitro*, sur le phénotype des CD, puis sur la polarisation des LT, afin de valider leurs propriétés immunomodulatrices.

II. Validation des propriétés immunomodulatrices des métabolites candidats identifiés

1. Evaluation des métabolites candidats purifiés sur CD

Les métabolites identifiés ont été évalués par le test immunologique *in vitro*, consistant pour rappel à l'analyse de la modulation de la maturation et de l'activation des CD sous stimulation LPS, par les métabolites purifiés. La technique utilisée était la même que celle présentée dans la partie II de la thèse, pour la caractérisation des métabolites purifiés et des SN de culture. Tous les métabolites ont été évalués à une concentration de 50µM. L'indole et deux de ses dérivés : IAA, I3A pour les métabolites immunosuppresseurs ainsi que la pyocheline et la pyocyanine concernant les métabolites immunostimulants. L'expérience a été réalisée en triplicat.

Nous avons pu observer que la pyocyanine et la pyocheline entraînaient une augmentation significative de l'expression du CMHII, contrairement à l'indole et ses dérivés qui n'entraînaient pas de modifications (Figure 103 A). Les sidérophores induisaient également une augmentation significative de l'expression des marqueurs de co-activation : CD40 et CD86. A l'inverse l'indole et l'I3A entraînaient une diminution significative de l'expression de ces marqueurs, quant à l'IAA aucune variation de l'expression n'a pu être observée (Figure 103 B). Concernant l'expression des molécules de co-inhibition, peu de variations ont été observées entre les métabolites purifiés. Les propriétés immunomodulatrices des immunométabolites identifiés ont pu être validées sur ce modèle, à l'exception de l'IAA pour lequel nous n'avons pas observé de modification de l'expression des marqueurs membranaires. Il faudra l'évaluer en association pour pouvoir conclure sur ses propriétés immunomodulatrices.

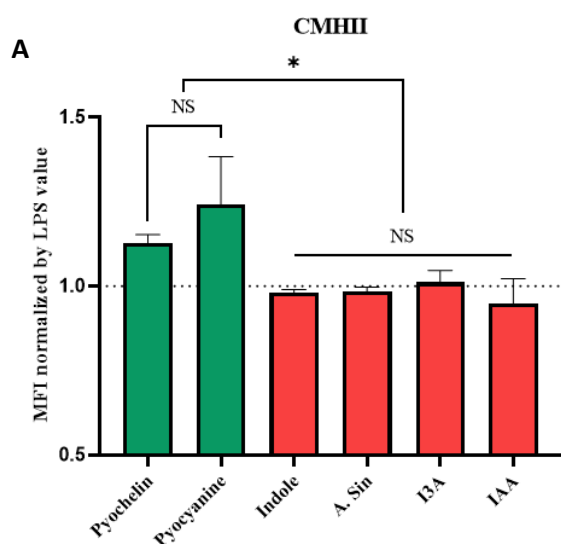
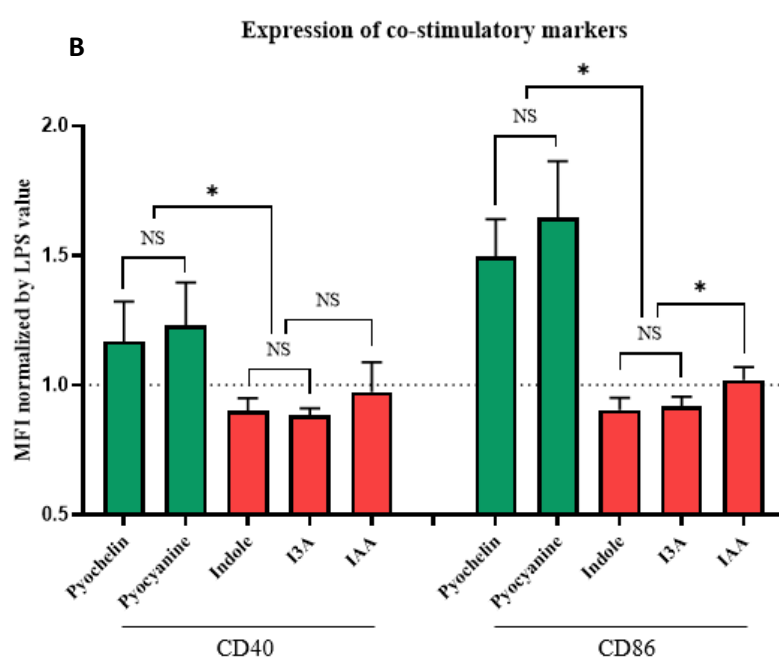


Figure 103 :
Investigation des métabolites immunomodulateurs par le test immunologique *in vitro*.
Evaluation de l'expression du CMHII (A) et des molécules de co-activation : CD40 et CD86 à la surface de la CD en fonction des modulations induite par les métabolites (B). Le seuil de 1 représente la valeur du LPS puisque les données obtenues pour chaque marqueur membranaire ont été normalisées par l'expression de celles obtenues sous stimulation LPS.



2. Evaluation des métabolites candidats sur Co-culture DC – lymphocytes

Les propriétés immunomodulatrices des métabolites candidats ont ensuite été validées par analyse de la polarisation des LT CD4+ *in vitro*, sur les co-cultures allogéniques de CD et de LT. Les techniques utilisées étaient les mêmes que celles présentées dans la partie II de ce travail de thèse. Dans cette partie expérimentale, les conditions testées étaient différentes. Les dérivés de l'indole n'ont pas été évalués pour cette première analyse sur des cellules issues de moelle, car plus difficiles à manipuler en termes de solubilité et de pH notamment. Nous avons évalué par ce test les deux sidérophores et l'indole, ainsi que la Kynurénine, la putrescine et la spermidine comme métabolites de référence pour évaluer les modulations induites par ces métabolites déjà connus. Les métabolites ont été utilisées à une concentration de 50µM.

Nous avons pu montrer que la polarisation des lymphocytes T induite par l'indole est similaire à ce que l'on observe avec la Kynurénine et la Spermidine et opposée à celle induite par les deux sidérophores et la putrescine. L'indole induit une proportion de Treg IL-10+ (CD4+CD25+FoxP3+IL-10+) plus importante (Figure 104). La Pyocheline entraîne la production de lymphocytes Th17 (CD4+IL-17+), la pyocyanine entraîne plutôt la production de cellules Th1 (CD4+IL-2+, TNFa+, CD4+INFg+). Ces résultats confirment les propriétés immunomodulatrices des métabolites identifiés par la corrélation des caractérisations immunologiques et métabolomiques.

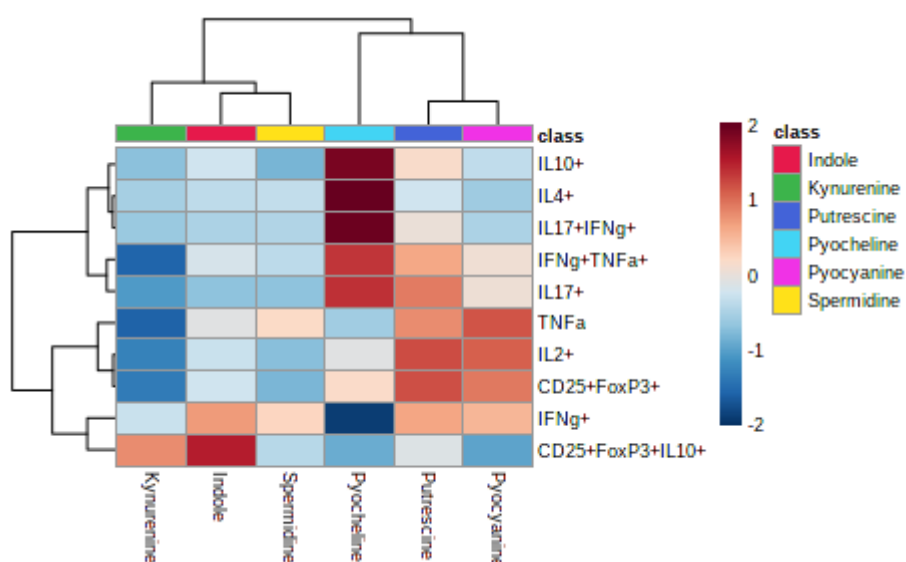


Figure 104 - Représentation des différentes populations de LT CD4+ obtenues par co-culture allogénique de CD-LT induites par les métabolites investigués pour leur propriétés immunomodulatrices. L'indole, la Spermidine et la Kynurénine induisent des polarisations similaires puisqu'elles sont sur le même bras de la heatmap. La Pyocyanine et la Putrescine présentent également des caractéristiques similaires tandis que la Pyocheline induit une polarisation qui lui est propre, même si ce métabolite est également identifié comme immunostimulant.

III. Investigation de différentes approches pour contrebalancer l'immunité induite par les souches, *in vivo* – Traitement post biotique

Les immunométabolites produits par les bactéries constituent également de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, différentes stratégies peuvent être envisagées pour rétablir une immunité adaptée et efficace permettant d'éliminer le pathogène. L'utilisation d'inhibiteurs des voies métaboliques d'intérêts identifiées ou d'ARN interférant permettrait de diminuer l'expression de certains métabolites, comme cela est déjà décrit avec les inhibiteurs de l'IDO dans les immunothérapies anti-cancéreuses³⁰⁶. De la même façon, l'administration de métabolites ayant des propriétés immunomodulatrices opposées à l'immunité induite par la souche, peut être une solution thérapeutique. Pour investiguer cette dernière hypothèse, nous avons cherché à moduler la réponse immunitaire induite *in vivo* par les souches.

1. Modèle utilisé pour l'étude de la compensation de la modulation immunitaire induite par les isolats cliniques.

Un challenge infectieux a été conduit, au cours duquel nous avons cherché à « compenser » le versant immunitaire induit par les souches immunostimulantes et immunosuppressives (Figure 105). Comme preuve de concept, la souche immunostimulante a été co-administrée avec un métabolite immunomodulateur connue pour ses propriétés immunosuppressives : la Kynurénine. A l'inverse, la souche immunosuppressive a été co-administrée avec l'exométabolome de la souche immunostimulante.

Les souches ont été cultivées de la même façon qu'au cours de la première expérience (cf partie II). Les cultures ont été dupliquées afin de pouvoir collecter pour chaque souche, une bactérie « contrôle » et une bactérie « compensée ». Avant administration, les souches immunostimulantes et immunosuppressives seules ont été resuspendues en PBS, après lavage du milieu de culture. La souche immunostimulante « compensée » a été resuspendue dans du PBS contenant la Kynurénine à une concentration de 1M. La souche immunosuppressive « compensée » a été resuspendue dans du PBS contenant les surnageants de la souche immunostimulante déprotéinisés et préalablement reconstitués à une concentration représentant 5 fois celle utilisée pour les tests immunologiques *in vitro*. L'augmentation de la concentration a pour objectif de nous permettre de pallier la réplication bactérienne. L'administration a été réalisée de nouveau sous la forme d'un prime et d'un boost pour générer une réponse immunitaire et induire la polarisation des LT, puis un deuxième boost pour remobiliser l'ensemble des cellules immunitaires au niveau pulmonaire. Au cours de l'infection, les souches produisent des métabolites immunomodulateurs de façon continue. Les métabolites purifiés ou les SN ont donc été réadministrés 3 fois toutes les 12h suivant l'administration de la souche pour continuer à « compenser » leur effet au cours du prime et du 1^{er} boost (Figure 105).

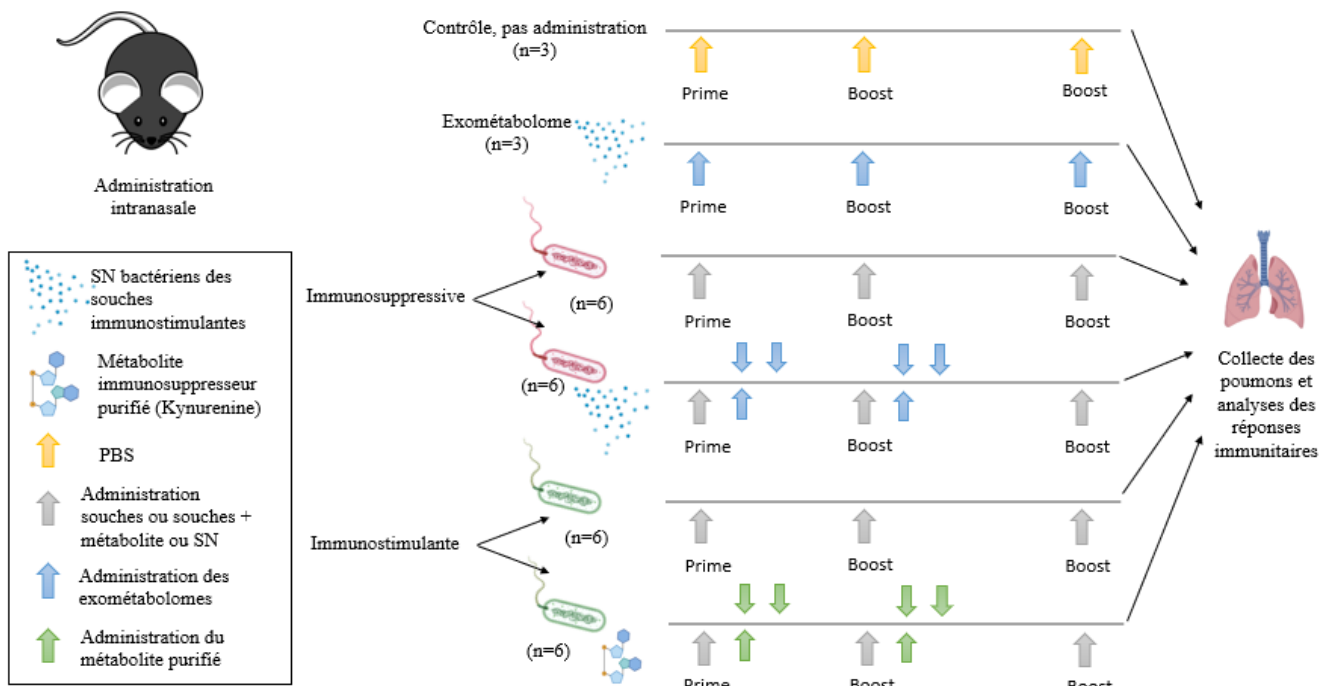


Figure 105 - Schéma du challenge infectieux conduit *in vivo* permettant d'évaluer la capacité d'un métabolite purifié ou d'un SN bactérien, à « compenser » l'immunité induite par la bactérie. Les souches ont été administrées par voie intra nasale. Un contrôle par administration de PBS a été mis en place pour évaluer l'immunité basale du poumon. Un groupe a également reçu uniquement des SN de souches, tandis que les autres ont reçu une des souches et sa compensation : la souche immunosuppressive est compensée par l'administration concomitante de SN de souche immunostimulante, tandis que la souche immunostimulante est compensée par l'administration de Kynurénine à haute dose. Après le prime et le premier boost, les « éléments de compensations » sont réadministrés à intervalle régulier. Après le 2^{ème} boost, les poumons sont collectés pour évaluer la réponse immunitaire développée vis-à-vis des souches inoculées.

2. Polarisation des LT induite *in vivo*, par les souches « compensées »

Enfin, nous avons évalué la polarisation des LT *in vivo*. Nous pouvons observer que la souche immunostimulante et le groupe auquel a été administré le SN seul sont très proches au niveau de la polarisation des LT obtenue (Figure 106). Dans les deux cas, une polarisation des LT vers un phénotype Th17 est retrouvé, mais aussi Th2 confirmant les observations de la première expérimentation. A l'inverse, la proportion la plus importante de LT régulateur producteur d'IL-10 est observée après administration de la souche immunosuppressive. Les souches « compensées » (immunostimulante + kynurénine et immunosuppressive + SN de souches pro-inflammatoire) présentent une polarisation des LT intermédiaire entre les deux souches. Différentes proportions de Th17 sont observées en fonction des souches et de l'ajout de SN ou de métabolites purifiés (Figure 107). L'exométabolome seul induit une forte augmentation de l'infiltrat Th17. Co-administré avec la souche immunosuppressive, il permet de restaurer une polarisation Th17. Cependant, il est intéressant de noter que l'effet est légèrement inférieur à celui du SN seul. Ceci met en évidence une probable inhibition de l'effet immunostimulant par les métabolites immunosuppresseurs

produits par les souches. Nous observons également une diminution de l'infiltrat Th17 lorsque que la souche immunostimulante est co-administrée avec de la Kynurénine. Les résultats obtenus nous permettent de conclure à l'efficacité de la stratégie de compensation utilisée, que ce soit par l'administration d'un métabolite purifié ou d'un SN complexe. Ils permettent également de mettre en évidence la puissance de l'immunomodulation induite uniquement par l'administration de l'exométabolome, en l'absence de la souche elle-même.

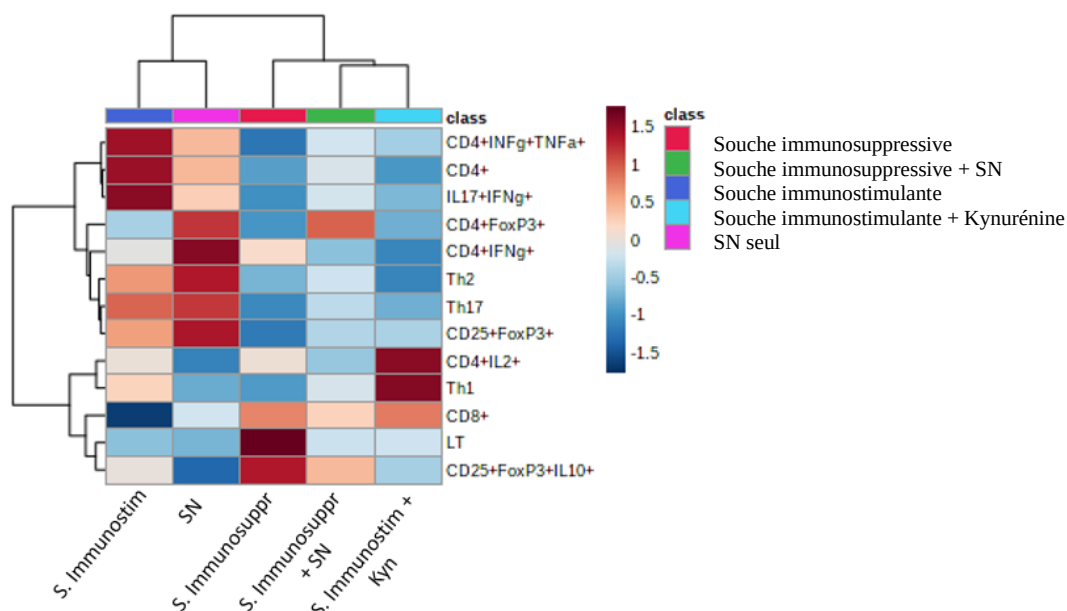


Figure 106 - Représentation des différentes polarisations induites par les souches, ou par les souches «compensées», ou par l'exométabolome de la souche immunostimulante seul. La compensation des souches modifie bien le profil de LT obtenue. Le SN seul induit une forte production de LT effecteurs.

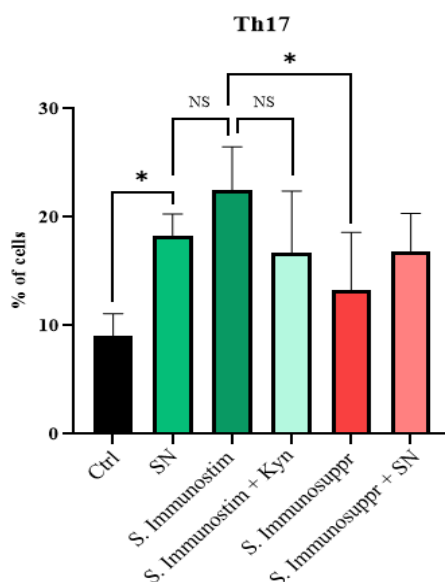


Figure 107 - Proportion de Th17 infiltrants le poumon lors de l'infection par les souches, ou par les souches «compensées», ou par l'exométabolome de la souche immunostimulante seul. Les plus fortes proportions sont retrouvées lors de l'infection par la souche immunostimulante puis lors de l'administration de SN seul, puis de façon assez équivalente lors de l'infection par les souches compensées, suivi par la souche immunosuppressive et enfin dans la condition contrôle.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence une corrélation forte entre les propriétés immunomodulatrices des souches et leur exométabolome. Une empreinte métabolique spécifique a ainsi pu être observée pour les différents sous-types de souches. Ces résultats suggèrent que le métabolisme global de la souche puisse être impliqué dans les immunomodulations observées. Cette hypothèse a pu être validée aussi bien sur les données générées sur l'endométabolome des souches, que sur les données de transcriptomique. Il sera intéressant de compléter cette observation par une analyse des données de génomique afin d'identifier les gènes impliqués dans les immunomodulations observées, mais également dans les interactions entre Pa et hôte ou Pa et les autres pathogènes.

La caractérisation des métabolites immunomodulateurs a permis de mettre en évidence que les souches immunosuppressives utilisent une voie de métabolisation du tryptophane alternative qui entraîne la production de métabolites décrits pour leurs propriétés immunosuppressives, tels que l'indole et ses dérivés : le 3-Methylindole, l'IAA et l'I3A. Ces métabolites présentent également d'autres propriétés. Ils sont capables de diminuer la production des sidérophores par Pa, mais aussi la virulence des autres pathogènes, pouvant expliquer l'observation que nous avons faite auparavant sur l'absence de co-infection par Sa ou *Candida albicans* chez les patients infectés par les souches immunosuppressives. Le Shikimate constitue également un métabolite intéressant et ses propriétés immunomodulatrices seront à investiguées *in vitro*. Les souches immunostimulantes surexpriment des métabolites issus de différentes voies de métabolisation du Chorismate. Il s'agit des molécules du quorum sensing, mais également les sidérophores, pyocyanine et pyocheline. Des données discordantes ont été publiées dans la littérature sur les capacités immunomodulatrices de la pyocyanine, et aucune donnée n'a été publiée sur la pyocheline. Le Succinate et le glutathion ont également été mis en évidence, tous les deux impliqués dans la génération et la réponse au stress oxydant. Nous avons pu valider les propriétés immunomodulatrices de l'indole, de la Pyocheline et de la Pyocyanine sur la polarisation des LT, et de l'I3A par le test immunologique *in vitro* conduit sur les CD. Ces derniers résultats seront complétés par l'évaluation de la polarisation des LT.

Enfin, les immunomodulations observées pour chaque souche *in vivo*, ont pu être « compensées » par l'ajout de métabolite ou de SN ayant des propriétés immunomodulatrices opposées à celles des souches administrées. Ceci confirme le rôle des métabolites *in vivo* et constitue une stratégie thérapeutique intéressante pour rétablir l'immunité vis-à-vis des souches de Pa responsables d'infections chroniques, mais également pour essayer de lutter contre les souches immunosuppressives qui semblent induire une détérioration de la fonction respiratoire des patients plus importante que les souches immunostimulantes. L'immunosuppression induite par les souches pourrait en effet conduire à un mécanisme d'échappement de la bactérie, responsable d'une prolifération accrue et à la survenue plus fréquente d'exacerbations.

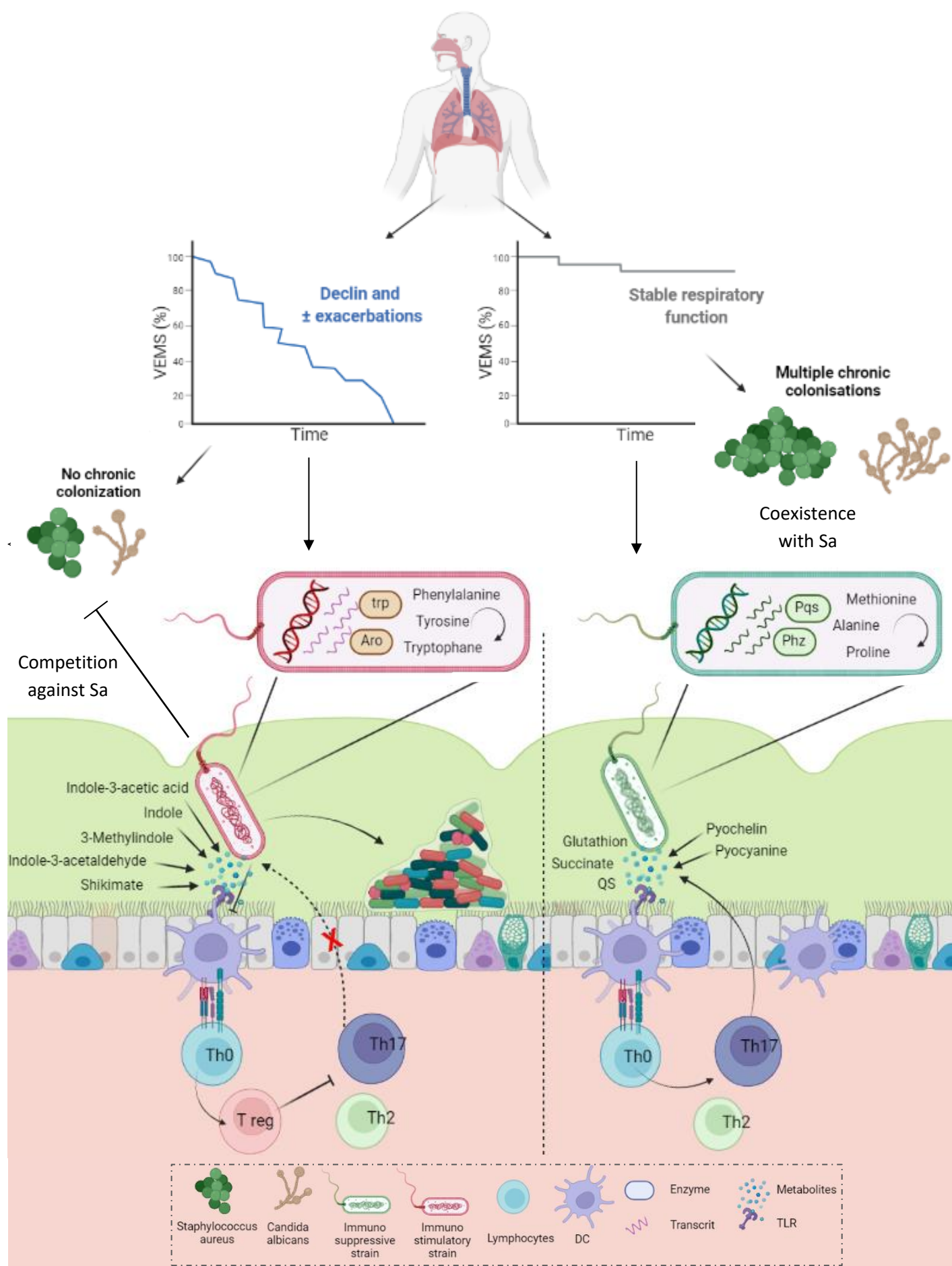


Figure 108 - Représentation des résultats de l'étude concernant l'identification des propriétés immunomodulatrices des souches de *Pa* infectant chroniquement les patients et caractérisation des métabolites et des voies métaboliques impliquées

Discussion

Dans ce travail de thèse, nous avons tout d'abord évalué les conséquences de l'infection chronique par Pa sur la fonction respiratoire de 32 patients atteints de mucoviscidose. Deux profils cliniques ont pu être mis en évidence :

- Des patients présentant une détérioration de leur fonction respiratoire plus importante et une fréquence plus élevée des exacerbations impactant la valeur du VEMS
- Et des patients ayant une certaine stabilité de la fonction respiratoire avec peu d'exacerbations au cours du suivi de l'étude, objectivé par un maintien du VEMS.

Il est intéressant de noter que de façon surprenante, les patients présentant les résultats cliniques les plus défavorables présentaient moins de co-infections par Sa et *Candida albicans* que les patients ayant une bonne fonction respiratoire. Ceci pourrait signer un phénotype plus agressif des isolats de Pa, vis-à-vis de l'hôte mais également des autres pathogènes.

Soixante-six isolats ont été collectés de façon longitudinale chez les patients de la cohorte. Ils ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique afin d'évaluer l'expression de certains facteurs de virulence, tels que la production de mucus ou de pigments, ou encore la cytotoxicité vis-à-vis des CD. Les souches ont été cultivées en milieu SCFM et les SN ont été collectés en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Après déprotéinisation, les SN ont fait l'objet d'une caractérisation immunologique afin d'évaluer si les métabolites excrétés pouvaient moduler l'immunité mais aussi une caractérisation métabolomique afin d'identifier quels métabolites pouvaient être à l'origine des différences observées.

Les résultats obtenus lors de la caractérisation immunologique, sous-tendent que Pa est capable de moduler l'immunité du patient vers un versant plutôt immunostimulant, entraînant la polarisation des LT vers un phénotype Th17, ou plutôt immunosuppresseur responsable notamment de la diminution de la réponse médiée par les Th17, impliquant les LT régulateurs. Nous avons pu montrer que cette modulation est médiée par la production de métabolites immunomodulateurs, capables de moduler le phénotype d'activation des CD *in vitro*, ainsi que la polarisation des LT subséquente *in vitro* et *in vivo*. Le modèle d'infection aigue *in vivo*, montre que ces immunomodulations sont indépendantes du phénotype de virulence de la bactérie.

Une inflammation dérégulée est décrite chez les patients atteints de mucoviscidose et ceci en dehors de tout contexte infectieux, causés par les mutations observées sur la protéine CFTR. Cette

hyper-inflammation, exacerbée lors des infections à Pa, est considérée comme néfaste pour l'évolution de la fonction respiratoire des patients. Il a cependant été montré que Pa, qui est un bacille versatile avec de fortes capacités d'adaptation à son environnement, était capable de mettre en place un certain nombre de mécanismes, tous orientés vers une diminution de la virulence de la souche. Ces adaptations reposent sur la perte de l'expression du SST3 ainsi que de son flagelle, sur la modification de son LPS ou sur la formation de SCV ou une diminution de la vitesse de croissance.

Un autre mécanisme de défense est représenté par la « transition mucoïde » décrite chez les souches de Pa lors du passage à la chronicité. Ceci lui permet de persister chez l'hôte, notamment en échappant au système immunitaire. Nous avons cependant pu observer que les souches de la banque perdaient leur phénotype mucoïde, soulevant l'hypothèse que cet état puisse être transitoire, participant seulement à la phase initiale de l'infection chronique. Ce phénomène, peu décrit, a néanmoins été observé dans une autre étude, montrant que ce mécanisme de défense, très consommateur en énergie pour la bactérie était remplacé par des mécanismes de lutte contre le stress oxydant au cours de l'infection chronique. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse sur d'autres banques de patients adultes présentant une infection chronique ancienne à Pa.

Dans la lignée de ces observations, nous avons pu montrer que les patients qui présentaient une altération de la fonction respiratoire étaient infectés par des souches immunosuppressives. Ceci constituerait un mécanisme d'échappement vis-à-vis du système immunitaire médié par la production de métabolites immunomodulateurs. La détérioration de la fonction respiratoire serait alors due à une prolifération non contrôlée de la bactérie. Les réponses pro-inflammatoires actuellement décrites comme néfastes, pourraient permettre au cours des infections chroniques d'obtenir un équilibre entre la bactérie et le système immunitaire, notamment représenté par les Th17. Comme décrit dans la littérature, nous avons également observé, dans une moindre mesure, une polarisation Th2 des LT. Si les Th2 sont associés à de mauvaises réponses cliniques chez les patients, ils pourraient permettre, en combinaison avec les Th17, de réguler la réponse immunitaire induite vis-à-vis des souches, et ainsi contenir la prolifération bactérienne.

Cette hypothèse nécessite d'être évaluée dans un modèle d'infection par les souches immunosuppressives et les souches immunostimulantes, afin de déterminer :

- La charge bactérienne intra-pulmonaire, ceci permettant d'identifier dans un premier temps si le système immunitaire pro-inflammatoire a la capacité de faire face à l'infection à Pa et si l'on observe une prolifération accrue de Pa lorsque la réponse Th17 notamment est inhibée.
- Mais aussi, les dommages causés aux poumons au cours de l'infection que ce soit par la bactérie, lors de l'infection par les souches immunosuppressives dans notre hypothèse, ou

par le système immunitaire lors de l'infection par les souches immunostimulantes. Ceci permettra d'évaluer quel versant de la balance pro ou anti-inflammatoire est le plus délétère.

Les observations que nous avons pu faire sur l'absence de co-infections par Sa chez les patients infectés par des souches immunosuppressives a été validé par évaluation des phénomènes de compétition ou de coexistence entre certaines souches de la banque et Sa. Cette expérimentation a mis en évidence une co-existence entre Sa et les souches immunostimulantes et une compétition avec les souches immunosuppressives. La présence des autres pathogènes tels que Sa ou *Candida albicans*, pourrait signer la constitution d'un « microbiote pulmonaire », dans lequel aucun pathogène ne prendrait l'ascendant et ne deviendrait majoritaire. Ces propos sont à modérer étant donné qu'il s'agit d'espèces pathogènes ayant leurs propres facteurs de virulence. Ceci nécessite d'autres expérimentations pour pouvoir réellement parler d'équilibre entre les bactéries et de microbiote.

La caractérisation métabolomique effectuée, nous a permis de mettre en évidence des différences dans l'exométabolome des souches entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance. Aucune différence n'a cependant pu être observée entre les isolats prélevés de façon précoce ou tardive chez les patients, ou entre les phénotypes de virulence des souches. Cependant, nous avons pu observer une surmortalité des CD induite par les métabolites excrétés. Cette première analyse nous a permis d'identifier des métabolites qui pourraient être responsable de la cytotoxicité observée sur les CD, tels que l'homocystéine, l'acide oxoadipique mais surtout des métabolites apparentés au cyanure d'hydrogène produit par Pa. Ces résultats devront être validés par une évaluation des métabolites de façon purifiée, sur des cultures de CD *in vitro*.

Nous avons également pu mettre en évidence des métabolites produits de façon différentielle entre les souches immunosuppressives ou immunostimulantes. Les souches immunosuppressives produisent notamment de l'indole et ses dérivés : l'I3A, l'IAA et le 3-méthylindole, capables d'orienter la polarisation des LT vers un phénotype T régulateur et d'inhiber la production des Th17. Ceci pourrait être médié par leur capacité à stimuler l'Ahr mais également par l'induction de l'IDO. L'indole a également été mis en évidence dans la communication inter-espèce et pourrait être à l'origine des interactions négatives entre Pa et Sa ou *Candida albicans*, conférant un avantage à Pa. Un autre métabolite intéressant a pu être identifié, il s'agit du shikimate, intermédiaire métabolique peu investigué mais dont les propriétés immunosuppressives ont déjà été mises en évidence sur des macrophages.

A l'inverse, les souches immunostimulantes produisent des facteurs de virulence tels que la Pyocheline, actuellement non connue pour ces propriétés immunomodulatrices mais également la

Pyocyanine dont les résultats discordants ne permettent pas de conclure quant aux propriétés immunomodulatrices. La production de succinate et de glutathion a également été mise en évidence, molécules connues pour leur implication dans le stress oxydant et l'hyper-inflammation observée chez les patients atteints de mucoviscidose. Nous avons également conduit une analyse sur les souches immunostimulantes dont le SN entraînait une expression variable du PD-L2 à la surface des CD. Une séparation marquée a pu être observée sur entre les souches PD-L2^{High} et PD-L2^{Low} et parmi les métabolites à l'origine de ces différences, le meso2,6-diaminopimelate et la N-acétylpermidine ont pu être mis en évidence comme surexprimés par les souches PD-L2^{High}.

Les propriétés immunomodulatrices des métabolites candidats identifiés : Pyocheline, Pyocyanine, Indole et I3A ont pu être validées *in vitro*, tant sur le phénotype d'activation des CD que sur la polarisation des LT. Les autres métabolites seront également évalués de façon purifiée mais aussi en association.

Nous avons également pu observer que l'exométabolome des souches immunosuppressive et immunostimulantes étaient bien distinctes permettant de mettre en évidence une empreinte métabolique spécifique, suggérant l'implication du métabolisme globale de la souche dans les immunomodulation observées. Ces résultats ont été validés sur les données générées sur l'endométabolome ainsi que sur les données de transcriptomiques, nous permettant de reconstituer les voies métaboliques impliquées dans la production des immunométabolites excrétés. Il sera intéressant d'identifier les gènes qui pourraient être impliqués dans la régulation de ces différentes voies métaboliques.

Enfin, nous avons montré que l'immunité induite *in vivo* par les souches immunostimulantes ou immunosuppressives pouvait être « compensée » par l'ajout de métabolites ou de SN ayant des propriétés immunomodulatrices opposées à celles des souches. Il est intéressant de noter que le SN des souches immunostimulantes était capable d'induire une réponse immunitaire équivalente à celle induite lors de l'administration de la souche elle-même. De façon similaire, nous avons pu observer que les souches immunosuppressives étaient capables de diminuer la réponse immunitaire pro-inflammatoire induite par le SN de la souche immunostimulante. Ces résultats valident et renforcent le concept de la modulation de l'immunité par les métabolites excrétés par la bactérie.

En perspective de ce travail, nous évaluerons les propriétés immunomodulatrices des métabolites candidats identifiés, par un challenge infectieux *in vivo*. Ces métabolites constituent d'intéressantes cibles thérapeutiques, qui pourraient être administrées directement pour moduler l'immunité. Les voies métaboliques associées pourraient également être amplifiées ou au contraire inhibées à la façon des immunothérapies, afin d'améliorer la réponse immunitaire vis-à-vis de Pa.

Conclusion

Au cours de ces travaux, nous avons pu mettre au point une méthodologie nous permettant de mettre en évidence les immunomodulations médiées par les métabolites mais également d'identifier ces immunométabolites dans des milieux complexes. Les propriétés immunomodulatrices des métabolites identifiées sur le phénotype de la CD par le test immunologique *in vitro*, corrélées à celles obtenues sur la polarisation des LT *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats soulignent que ce test est sensible et robuste pour permettre de screener de nouveaux métabolites candidats, mais également qu'il constitue une alternative rapide et simple d'utilisation pour cette caractérisation, notamment en comparaison avec les expérimentations *in vivo*.

En conclusion, les résultats obtenus, nous ont permis de mettre en évidence que les souches pathogènes de Pa infectant chroniquement des patients atteints de mucoviscidose, étaient capables d'induire des réponse pro ou anti-inflammatoires, responsables de la modulation de la réponse médiée par les Th17. Les immunomodulations observées étaient dues à l'excrétion de métabolites aux propriétés immunomodulatrices et indépendantes des facteurs de virulence exprimés par les souches.

L'association des approches par métabolomique non ciblée et des caractérisations immunologiques effectuées, nous ont permis d'identifier des métabolites immunomodulateurs candidats, qui ont par la suite pu être validés *in vitro*. Le métabolisme global de la souche a pu être impliqué dans ces immunomodulations que ce soit par l'identification d'une empreinte métabolique spécifique aux types de souches immunostimulantes ou immunosuppressive mais aussi par la mise en évidence de corrélation avec les résultats obtenus sur l'endométabolome des souches ou sur les données de transcriptomique.

Le déclin de la fonction respiratoire des patients de la cohorte a pu être corrélé avec l'infection par des souches immunosuppressives mettant en évidence un potentiel mécanisme d'échappement vis à vis du système immunitaire. Cependant, l'hyper-inflammation observée chez les patients atteints de mucoviscidose a également été décrit comme délétère pour le patient, ce qui pourrait finalement mettre en évidence qu'il n'existe pas de bonne réponse immunitaire développée contre Pa dans les infections chroniques des patients atteints de mucoviscidose. L'investigation de ces deux axes *in vitro* et *in vivo* est une perspective majeure pour comprendre les mécanismes induisant la détérioration de la fonction respiratoire des patients infectés chroniquement par Pa.

De façon étonnante, les patients présentant un déclin de la fonction respiratoire étaient également ceux qui ne présentaient pas de co-infections à Pa ou Sa, mettant en évidence un mécanisme de compétition entre les souches immunosuppressives et les autres pathogènes, pouvant signer un phénotype particulièrement agressif que ce soit vis-à-vis de l'hôte ou des autres pathogènes. L'ensemble des résultats obtenus sont résumés sur la figure 108.

Ces découvertes constituent de nouvelles pistes tout d'abord, pour la compréhension du dialogue hôte/pathogène, mettent en évidence l'importance des modulations médiées par la production d'immunométabolites. Ils pourraient ainsi constituer un axe majeur de la modulation de l'immunité mais aussi un « 4^{ème} signal » d'intérêt à prendre en compte dans la polarisation des LT. Ceci ouvre de nouvelles perspectives de traitement pour prendre en charge ces infections bactériennes persistantes qui peuvent conduire au décès du patient, et pour lesquelles les résistances vis-à-vis des antibiotiques sont en constante augmentation.

Références

1. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: How epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European Respiratory Journal*. 2004;23(2):327-333. doi:10.1183/09031936.03.00098803
2. Faure K, Leberre R, Guery B. Pseudomonas aeruginosa and Surfactant-associated Proteins A and D. *Medecine et Maladies Infectieuses*. 2006;36(2):63-71. doi:10.1016/j.medmal.2005.08.011
3. Ragland SA, Criss AK. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathogens*. 2017;13(9). doi:10.1371/journal.ppat.1006512
4. Istivan TS, Coloe PJ. Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology (N Y)*. 2006;152(5):1263-1274. doi:10.1099/mic.0.28609-0
5. Qu XD, Lehrer RI. *Secretory Phospholipase A 2 Is the Principal Bactericide for Staphylococci and Other Gram-Positive Bacteria in Human Tears*. Vol 66.; 1998.
6. Trémolières F. Épidémiologie microbienne des infections respiratoires basses actualités. *Medecine et Maladies Infectieuses*. 2006;36(11-12):546-554. doi:10.1016/j.medmal.2006.05.013
7. Doss M, White MR, Tecle T, Hartshorn KL. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010;87(1):79-92. doi:10.1189/jlb.0609382
8. Xu D, Lu W. Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity. *Frontiers in Immunology*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00764
9. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*. 2012;70(SUPPL. 1). doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x
10. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*. 2017;3(1):71-82. doi:10.1016/J.ENG.2017.01.008
11. Sekirov I, Russell SL, Caetano L, Antunes M, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. Published online 2010. doi:10.1152/physrev.00045.2009.-Gut
12. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014;157(1):121-141. doi:10.1016/j.cell.2014.03.011
13. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*. 2020;30(6):492-506. doi:10.1038/s41422-020-0332-7
14. Invernizzi R, Lloyd CM, Molyneaux PL. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology*. 2020;160(2):171-182. doi:10.1111/imm.13195

15. Hiemstra PS. Parallel activities and interactions between antimicrobial peptides and complement in host defense at the airway epithelial surface. *Molecular Immunology*. 2015;68(1):28-30. doi:10.1016/j.molimm.2015.07.030
16. Pandya PH, Wilkes DS. Complement system in lung disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2014;51(4):467-473. doi:10.1165/rcmb.2013-0485TR
17. Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. In: *Proceedings of the American Thoracic Society*. Vol 2. American Thoracic Society; 2005:403-411. doi:10.1513/pats.200508-090js
18. Murphy Kenneth, Casey Weaver. *Janeway's Immunobiology*. 9th ed.; 2016.
19. Wang Y, Zhao M, Liu S, et al. Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell Death and Disease*. 2020;11(10). doi:10.1038/s41419-020-03127-z
20. Riquelme SA, Wong Fok Lung T, Prince A. Pulmonary Pathogens Adapt to Immune Signaling Metabolites in the Airway. *Frontiers in Immunology*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00385
21. Xu M, Li N, Fan X, et al. *Differential Effects of Toll-Like Receptor Signaling on the Activation of Immune Responses in the Upper Respiratory Tract.*; 2022.
22. Kado S, Chang WLW, Chi AN, Wolny M, Shepherd DM, Vogel CFA. Aryl hydrocarbon receptor signaling modifies Toll-like receptor-regulated responses in human dendritic cells. *Archives of Toxicology*. 2017;91(5):2209-2221. doi:10.1007/s00204-016-1880-y
23. Genestet Charlotte. *Dialogue Inter-Règne Entre Pseudomonas Aeruginosa et Les Cellules de l'immunité Innée. Rôle de La Production de L-Kynurénine Par Les Bactéries*. UGA; 2014.
24. Yeung AWS, Terentis AC, King NJC, Thomas SR. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. *Clinical Science*. 2015;129(7):601-672. doi:10.1042/CS20140392
25. Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*. 2014;159(7):1497-1509. doi:10.1016/j.cell.2014.11.024
26. Sun J. Pathogenic Bacterial Proteins and their Anti-Inflammatory Effects in the Eukaryotic Host. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. 2009;8(3):214-227. doi:10.2174/187152309789151986
27. Mues N, Chu HW. Out-Smarting the Host: Bacteria Maneuvering the Immune Response to Favor Their Survival. *Frontiers in Immunology*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00819
28. Ríos-López AL, González GM, Hernández-Bello R, Sánchez-González A. Avoiding the trap: Mechanisms developed by pathogens to escape neutrophil extracellular traps. *Microbiological Research*. 2021;243. doi:10.1016/j.micres.2020.126644
29. Kogut MH, Lee A, Santin E. Microbiome and pathogen interaction with the immune system. *Poultry Science*. 2020;99(4):1906-1913. doi:10.1016/j.psj.2019.12.011

30. Reddick LE, Alto NM. Bacteria fighting back: How pathogens target and subvert the host innate immune system. *Molecular Cell*. 2014;54(2):321-328. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.010
31. Finlay BB, McFadden G. Anti-immunology: Evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*. 2006;124(4):767-782. doi:10.1016/j.cell.2006.01.034
32. Bortolotti P, Hennart B, Thieffry C, et al. Tryptophan catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and potential for inter-kingdom relationship. *BMC Microbiology*. 2016;16(1):1-10. doi:10.1186/s12866-016-0756-x
33. Moyne O, Castelli F, Bicout DJ, et al. Metabotypes of *pseudomonas aeruginosa* correlate with antibiotic resistance, virulence and clinical outcome in cystic fibrosis chronic infections. *Metabolites*. 2021;11(2):1-20. doi:10.3390/metabo11020063
34. Proietti E, Rossini S, Grohmann U, Mondanelli G. Polyamines and Kynurenines at the Intersection of Immune Modulation. *Trends in Immunology*. 2020;41(11):1037-1050. doi:10.1016/j.it.2020.09.007
35. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*. 2017;15(8):453-464. doi:10.1038/nrmicro.2017.42
36. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens.
37. Zemanick ET, Wagner BD, Robertson CE, et al. Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis. doi:10.1183/13993003.00832
38. Hauser AR. *Pseudomonas aeruginosa*: So many virulence factors, so little time. *Critical Care Medicine*. 2011;39(9):2193-2194. doi:10.1097/CCM.0b013e318221742d
39. Behrends V, Ryall B, Zlosnik JEA, Speert DP, Bundy JG, Williams HD. Metabolic adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis chronic lung infections. *Environmental Microbiology*. 2013;15(2):398-408. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02840.x
40. Fanen P, Hasnain A. Cystic fibrosis and CFTR gene. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2011;(1). doi:10.4267/2042/37827
41. Quon BS, Rowe SM. New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ*. 2016;352:i859. doi:10.1136/bmj.i859
42. Hanssens LS, Duchateau J, Casimir GJ. Cftr protein: Not just a chloride channel? *Cells*. 2021;10(11). doi:10.3390/cells10112844
43. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: Treating the basic defect in all patients. *Journal of Internal Medicine*. 2015;277(2):155-166. doi:10.1111/joim.12314
44. Malhotra S, Hayes D, Wozniak DJ. *Cystic Fibrosis and Pseudomonas Aeruginosa: The Host-Microbe Interface*.; 2019. <https://doi.org/10>
45. Académie Nationale de Médecine. Maladies rares, mais fréquentes : accroître les efforts engagés en France et en Europe. *Communiqué*. Published online 2021.

46. DEHILLOTTE Clémence, LEMONNIER lydie. *REGISTRE FRANÇAIS DE LA MUCOVISCIDOSE.*; 2019.
47. Castellani C, Assael BM. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(1):129-140. doi:10.1007/s00018-016-2393-9
48. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(2):194-222. doi:10.1128/CMR.15.2.194-222.2002
49. Garcia B, Flume PA. Pulmonary Complications of Cystic Fibrosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2019;40(6):804-809. doi:10.1055/s-0039-1697639
50. Martin C, Hamard C, Kanaan R, et al. Étude des causes de décès des patients mucoviscidosiques en France : 2007–2010. *Revue des Maladies Respiratoires*. 2015;32:A8-A9. doi:10.1016/j.rmr.2014.11.023
51. Aubourg F. *Explorations Fonctionnelles Respiratoires de l'adulte*.
52. Kerem Eitan, Reisman Joseph, Corey Mary, Canny J. Gerard, Levison Henry. Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*. Published online 1992.
53. Geiser-Vrtek P, Soccal PM, Rochat T. Quand faut-il référer un patient adulte atteint de mucoviscidose à un centre de transplantation pulmonaire. *Revue Médicale Suisse*. Published online 2008.
54. F.P. Counil CKMLBSMMNLLCIFMRGMBRGAD. Mucoviscidose : du bon usage des explorations fonctionnelles respiratoires .
55. *REGISTRE FRANÇAIS DE LA MUCOVISCIDOSE*.
56. Stenbit AE, Flume PA. Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2011;17(6):442-447. doi:10.1097/MCP.0b013e32834b8c04
57. HAS. *Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDs) Mucoviscidose Centre de Référence Mucoviscidose.*; 2017.
58. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: An evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(12):841-851. doi:10.1038/nrmicro2907
59. Govan JRW, Brown AR, Jones AM. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiology*. 2007;2(2):153-164. doi:10.2217/17460913.2.2.153
60. ACKERLEY C, TULLIS E, SAJJAN U, et al. Immunolocalisation of *Burkholderia cepacia* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Journal of Medical Microbiology*. 2001;50(6):535-546. doi:10.1099/0022-1317-50-6-535
61. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: A mucosal immunodeficiency syndrome. *Nature Medicine*. 2012;18(4):509-519. doi:10.1038/nm.2715

62. Santé Publique France. *Enquete Nationale de Prévalence Des Infections Nosocomiales et Des Traitements Anti-Infectieux En Établissements de Santé En France.*; 2017.
63. Iglewski BH. *Pseudomonas - Medical Microbiology*. 4th edition.
64. *Conférence de Consensus - Prise En Charge Du Patient Atteint de Mucoviscidose.*; 2002.
65. Murphy BS, Sundareshan V, Cory TJ, Hayes D, Anstead MI, Feola DJ. Azithromycin alters macrophage phenotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;61(3):554-560. doi:10.1093/jac/dkn007
66. Caroff M, Novikov A. Lipopolysaccharides: Structure, function and bacterial identification. *OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids*. 2020;27. doi:10.1051/ocl/2020025
67. Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens*. 2020;9(1). doi:10.3390/pathogens9010006
68. Needham BD, Trent MS. Fortifying the barrier: The impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*. 2013;11(7):467-481. doi:10.1038/nrmicro3047
69. Shin HS, Lee JH, Paek SH, Jung YW, Ha UH. *Pseudomonas aeruginosa*-dependent upregulation of TLR2 influences host responses to a secondary *Staphylococcus aureus* infection. *Pathogens and Disease*. 2013;69(2):149-156. doi:10.1111/2049-632X.12074
70. Khalifa ABH, Moissenet D, Thien HV, Khedher M. Les facteurs de virulence de *pseudomonas aeruginosa*: Mécanismes et modes de régulations. *Annales de Biologie Clinique*. 2011;69(4):393-403. doi:10.1684/abc.2011.0589
71. MONTIET TC, Doyle-huntzinger D, Craven RC, Holder IA. *Loss of Virulence Associated with Absence of Flagellum in an Isogenic Mutant of Pseudomonas Aeruginosa in the Burned-Mouse Model*. Vol 38.; 1982.
72. O'toole GA, Kolter R. *Flagellar and Twitching Motility Are Necessary for Pseudomonas Aeruginosa Biofilm Development*.
73. Dimango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A. *Diverse Pseudomonas Aeruginosa Gene Products Stimulate Respiratory Epithelial Cells to Produce Interleukin-8*.
74. Feldman M, Bryan R, Rajan S, et al. *Role of Flagella in Pathogenesis of Pseudomonas Aeruginosa Pulmonary Infection*. Vol 66.; 1998.
75. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2004;30(5):627-634. doi:10.1165/rcmb.2003-0260OC
76. Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: Type IV pili in action. *Annual Review of Microbiology*. 2012;66:493-520. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150055

77. Tan RM, Kuang Z, Hao Y, Lau GW. Type iv pilus of pseudomonasaeruginosa confers resistance to antimicrobial activities of the pulmonary surfactant protein-a. *Journal of Innate Immunity*. 2014;6(2):227-239. doi:10.1159/000354304
78. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GPF, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010;300(8):534-543. doi:10.1016/j.ijmm.2010.08.005
79. Wretlind B, Pavlovskis OR. The role of proteases and exotoxin A in the pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa infections. *Scand J Infect Dis Suppl*. Published online 1981.
80. Ariane Biquand. *Les Infections à Pseudomonas Aeruginosa et Leurs Traitements En 2017*. 2017.
81. Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, et al. Pseudomonas aeruginosa Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways . *The Journal of Immunology*. 2012;188(1):386-393. doi:10.4049/jimmunol.1102162
82. Sharma KM, Kumar R, Panwar S, Kumar A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15(1):115-126. doi:10.1016/j.jgeb.2017.02.001
83. Horvat RT, Parmely MJ. *Pseudomonas Aeruginosa Alkaline Protease Degrades Human Gamma Interferon and Inhibits Its Bioactivity*. Vol 56.; 1988. <https://journals.asm.org/journal/iai>
84. Matheson NR, Potempa J, Travis J. Interaction of a novel form of Pseudomonas aeruginosa alkaline protease (aeruginolysin) with interleukin-6 and interleukin-8. In: *Biological Chemistry*. Vol 387. ; 2006:911-915. doi:10.1515/BC.2006.115
85. Wretlind B, Pavlovskis OR. *Pseudomonas Aeruginosa Elastase and Its Role in Pseudomonas Infections*. Vol 5. <http://cid.oxfordjournals.org/>
86. van der Plas MJA, Bhongir RKV, Kjellström S, et al. Pseudomonas aeruginosa elastase cleaves a C-terminal peptide from human thrombin that inhibits host inflammatory responses. *Nature Communications*. 2016;7. doi:10.1038/ncomms11567
87. Heck LW, Alarcon PG, Kulhavy RM, Morihara K, Russell MW, Mestecky JF. Degradation of IgA proteins by Pseudomonas aeruginosa elastase. *J Immunol*. Published online 1990.
88. Bainbridge T, Fick RB Jr. Functional importance of cystic fibrosis immunoglobulin G fragments generated by Pseudomonas aeruginosa elastase. *J Lab Clin Med*. Published online 1989.
89. D. Szamosvári, v. F. Reichle, M. Jureschi, T. Böttcher. Synthetic quinolone signal analogues inhibiting the virulence factor elastase of Pseudomonas aeruginosa. In: *The Royal Society of Chemistry*. Vol 2019-November. American Institute of Chemical Engineers; 2013. doi:10.1039/x0xx00000x
90. Garcia-Arcos I, Park SS, Mai M, et al. LRP1 loss in airway epithelium exacerbates smoke-induced oxidative damage and airway remodeling. *Journal of Lipid Research*. 2022;63(4):100185. doi:10.1016/j.jlr.2022.100185

91. Mishra A, Yao X, Saxena A, et al. Low-density lipoprotein receptor–related protein 1 attenuates house dust mite–induced eosinophilic airway inflammation by suppressing dendritic cell–mediated adaptive immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;142(4):1066-1079.e6. doi:10.1016/j.jaci.2017.10.044
92. Talme T, Bergdahl E, Sundqvist KG. Regulation of T-lymphocyte motility, adhesion and de-adhesion by a cell surface mechanism directed by low density lipoprotein receptor-related protein 1 and endogenous thrombospondin-1. *Immunology*. 2014;142(2):176-192. doi:10.1111/imm.12229
93. Michalska M, Wolf P. Pseudomonas Exotoxin A: Optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6(SEP). doi:10.3389/fmicb.2015.00963
94. The mechanism of action of the Pseudomonas aeruginosa-encoded type III cytotoxin, ExoU.
95. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier GB. *Acquisition of Expression of the Pseudomonas Aeruginosa ExoU Cytotoxin Leads to Increased Bacterial Virulence in a Murine Model of Acute Pneumonia and Systemic Spread*. Vol 68.; 2000.
96. Lin HH, Huang SP, Teng HC, Ji D der, Chen YS, Chen YL. Presence of the exoU gene of Pseudomonas aeruginosa is correlated with cytotoxicity in MDCK cells but not with colonization in BALB/c mice. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(12):4596-4597. doi:10.1128/JCM.01531-06
97. Kaminski A, Gupta KH, Goldufsky JW, Lee HW, Gupta V, Shafikhani SH. Pseudomonas aeruginosa ExoS Induces Intrinsic Apoptosis in Target Host Cells in a Manner That is Dependent on its GAP Domain Activity. *Scientific Reports*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-32491-2
98. Epelman S, Stack D, Bell C, et al. Different Domains of Pseudomonas aeruginosa Exoenzyme S Activate Distinct TLRs . *The Journal of Immunology*. 2004;173(3):2031-2040. doi:10.4049/jimmunol.173.3.2031
99. Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW. *ExoY, an Adenylate Cyclase Secreted by the Pseudomonas Aeruginosa Type III System*. Vol 95.; 1998. www.pnas.org.
100. Dacheux D, Toussaint B, Richard M, Brochier G, Croize J, Attree I. *Pseudomonas Aeruginosa Cystic Fibrosis Isolates Induce Rapid, Type III Secretion-Dependent, but ExoU-Independent, Oncosis of Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils*. Vol 68.; 2000.
101. Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA. *Pyoverdin Is Essential for Virulence of Pseudomonas Aeruginosa*. Vol 64.; 1996.
102. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. *Siderophore-Mediated Signaling Regulates Virulence Factor Production in Pseudomonas Aeruginosa*. www.pseudomonas.com
103. Cox CD. *Effect of Pyochelin on the Virulence of Pseudomonas Aeruginosa*. Vol 36.; 1982.

104. Caffaratti C, Plazy C, Mery G, et al. What we know so far about the metabolite-mediated microbiota-intestinal immunity dialogue and how to hear the sound of this crosstalk. *Metabolites*. 2021;11(6). doi:10.3390/metabo11060406
105. Holm A, Vikström E. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: Signals, targets, and functions. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5(JUN). doi:10.3389/fpls.2014.00309
106. Kobayashi H. *Airway Biofilms Implications for Pathogenesis and Therapy of Respiratory Tract Infections*. Vol 4.; 2005.
107. Martha B, Croisier D, Fanton A, et al. Factors associated with mucoid transition of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(6):617-623. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02786.x
108. Drenkard E, Ausubel FM. *Competing Interests Statement Pseudomonas Biofilm Formation and Antibiotic Resistance Are Linked to Phenotypic Variation.*; 2002. www.nature.com
109. Limoli DH, Rockel AB, Host KM, et al. Cationic Antimicrobial Peptides Promote Microbial Mutagenesis and Pathoadaptation in Chronic Infections. *PLoS Pathogens*. 2014;10(4). doi:10.1371/journal.ppat.1004083
110. Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, et al. *Mucoid Conversion of Pseudomonas Aeruginosa by Hydrogen Peroxide: A Mechanism for Virulence Activation in the Cystic Fibrosis Lung*. Vol 145.
111. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*. 2002;56:187-209. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
112. Flemming HC, Wingender J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol*. Published online 2001.
113. Racha Majed. *Etude de Eps1 et Eps2, Deux Exopolysaccharides Du Biofilm Chez Bacillus Thuringiensis*. 2017.
114. Wu W, Badrane H, Arora S, Baker H v., Jin S. MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2004;186(22):7575-7585. doi:10.1128/JB.186.22.7575-7585.2004
115. la Rosa R, Rossi E, Feist AM, Johansen HK, Molin S. Compensatory evolution of *Pseudomonas aeruginosa*'s slow growth phenotype suggests mechanisms of adaptation in cystic fibrosis. *Nature Communications*. 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-23451-y
116. Whooley MA, McLoughlin AJ. *Applied Microbiology and Biotechnology The Regulation of Pyoverdinin Production in Pseudomonas Aeruginosa*. Vol 15.; 1982.
117. Kragh KN, Alhede M, Jensen P, et al. Polymorphonuclear leukocytes restrict growth of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infection and Immunity*. 2014;82(11):4477-4486. doi:10.1128/IAI.01969-14

118. HauBler Susanne, Burkhard Tummler, Harmut WeiBbrodt, Manfred Rohde, Ivo Steinmetz. *Small-Colony Variants of Pseudomonas Aeruginosa in Cystic Fibrosis.*; 1999. <http://cid.oxfordjournals.org/>
119. Pestrak MJ, Chaney SB, Eggleston HC, et al. Pseudomonas aeruginosa rugose small-colony variants evade host clearance, are hyper-inflammatory, and persist in multiple host environments. *PLoS Pathogens*. 2018;14(2). doi:10.1371/journal.ppat.1006842
120. Wong Fok Lung T, Monk IR, Acker KP, et al. Staphylococcus aureus small colony variants impair host immunity by activating host cell glycolysis and inducing necroptosis. *Nature Microbiology*. 2020;5(1):141-153. doi:10.1038/s41564-019-0597-0
121. Tuchscher L, Medina E, Hussain M, et al. Staphylococcus aureus phenotype switching: An effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Molecular Medicine*. 2011;3(3):129-141. doi:10.1002/emmm.201000115
122. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011;24(1):29-70. doi:10.1128/CMR.00036-10
123. Mahenthiralingam E, Speert DP. *Nonopsonic Phagocytosis of Pseudomonas Aeruginosa by Macrophages and Polymorphonuclear Leukocytes Requires the Presence of the Bacterial Flagellum*. Vol 63.; 1995.
124. Cigana C, Curcuru L, Leone. MR, et al. Pseudomonas aeruginosa exploits lipid a and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PLoS ONE*. 2009;4(12). doi:10.1371/journal.pone.0008439
125. Corech R, Rao A, Laxova A, et al. Early immune response to the components of the type III system of Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(8):3956-3962. doi:10.1128/JCM.43.8.3956-3962.2005
126. Dacheux D, Attree I, Toussaint B. Expression of ExsA in trans confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates. *Infection and Immunity*. 2001;69(1):538-542. doi:10.1128/IAI.69.1.538-542.2001
127. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology (N Y)*. 2001;147(10):2659-2669. doi:10.1099/00221287-147-10-2659
128. Nguyen AT, O'Neill MJ, Watts AM, et al. Adaptation of iron homeostasis pathways by a Pseudomonas aeruginosa pyoverdine mutant in the cystic fibrosis lung. *Journal of Bacteriology*. 2014;196(12):2265-2276. doi:10.1128/JB.01491-14
129. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19(2):403-434. doi:10.1128/CMR.19.2.403-434.2006
130. Hatzenbuehler J, Pulling TJ. *Diagnosis and Management of Osteomyelitis of Osteomyelitis*. Vol 84.; 2011. www.aafp.org/afpAmericanFamilyPhysician1027

131. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Jakobsen TH, et al. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS ONE*. 2010;5(4). doi:10.1371/journal.pone.0010115
132. Elizur A, Cannon CL, Ferkol TW. Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest*. 2008;133(2):489-495. doi:10.1378/chest.07-1631
133. Mueller-Ortiz SL, Drouin SM, Wetsel RA. The Alternative Activation Pathway and Complement Component C3 Are Critical for a Protective Immune Response against *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Model of Pneumonia. *Infection and Immunity*. 2004;72(5):2899-2906. doi:10.1128/IAI.72.5.2899-2906.2004
134. van de Weert-van Leeuwen PB, van Meegen MA, Speirs JJ, et al. Optimal complement-mediated phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by monocytes is cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2013;49(3):463-470. doi:10.1165/rcmb.2012-0502OC
135. Schroeder TH, Lee MM, Yacono PW, et al. *CFTR Is a Pattern Recognition Molecule That Extracts Pseudomonas Aeruginosa LPS from the Outer Membrane into Epithelial Cells and Activates NF-B Translocation*. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.092160899
136. Parker D, Cohen TS, Alhede M, Harfenist BS, Martin FJ, Prince A. Induction of type I interferon signaling by *Pseudomonas aeruginosa* is diminished in cystic fibrosis epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2012;46(1):6-13. doi:10.1165/rcmb.2011-0080OC
137. Bomberger JM, Ye S, MacEachran DP, et al. A *Pseudomonas aeruginosa* toxin that hijacks the host ubiquitin proteolytic system. *PLoS Pathogens*. 2011;7(3). doi:10.1371/journal.ppat.1001325
138. Muhlebach MS, Stewart PW, Leigh MW, Noah TL. *Quantitation of Inflammatory Responses to Bacteria in Young Cystic Fibrosis and Control Patients*. Vol 160.; 1999. www.atsjournals.org
139. 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;77(12):5300-5310. doi:10.1128/IAI.00501-09
140. Painter RG, Bonvillain RW, Valentine VG, et al. The role of chloride anion and CFTR in killing of *Pseudomonas aeruginosa* by normal and CF neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008;83(6):1345-1353. doi:10.1189/jlb.0907658
141. le Gars M, Descamps D, Roussel D, et al. Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2013;187(2):170-179. doi:10.1164/rccm.201205-0875OC
142. Hartl D, Gaggari A, Bruscia E, et al. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2012;11(5):363-382. doi:10.1016/j.jcf.2012.07.003

143. Lichtnekert J, Kawakami T, Parks WC, Duffield JS. Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. *Current Opinion in Pharmacology*. 2013;13(4):555-564. doi:10.1016/j.coph.2013.05.013
144. Murphy BS, Bush HM, Sundareshan V, et al. Characterization of macrophage activation states in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2010;9(5):314-322. doi:10.1016/j.jcf.2010.04.006
145. Baldwin MR, Barbieri J T. *The Type III Cytotoxins of Yersinia and Pseudomonas Aeruginosa That Modulate the Actin Cytoskeleton*. Vol 291. Springer-Verlag; 2005.
146. Boontham P, Robins A, Chandran P, et al. Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: Possible link in human sepsis. *Clinical Science*. 2008;115(11):343-351. doi:10.1042/CS20080018
147. Roghanian A, Drost EM, MacNee W, Howie SEM, Sallenave JM. Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006;174(11):1189-1198. doi:10.1164/rccm.200605-632OC
148. Worgall S, Kikuchi T, Singh R, Martushova K, Lande L, Crystal RG. Protection against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* following immunization with *P. aeruginosa*-pulsed dendritic cells. *Infection and Immunity*. 2001;69(7):4521-4527. doi:10.1128/IAI.69.7.4521-4527.2001
149. Peluso L, de Luca C, Bozza S, et al. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice by recombinant OprF-pulsed dendritic cell immunization. *BMC Microbiology*. 2010;10. doi:10.1186/1471-2180-10-9
150. Mukae H, Urabe K, Yanagihara K, 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 Journal of Experimental Medicine*. 2010;220(1):59-65. doi:10.1620/tjem.220.59
151. Skindersoe ME, Zeuthen LH, Brix S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2009;55(3):335-345. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00533.x
152. Sorensen RU, Ruuskanen O, Miller K, Stern RC. B-lymphocyte function in cystic fibrosis. *Eur J Respir Dis*. Published online 1983.
153. Moser, C, Kjaergaard S, Pressler T, Kharazmi, Christian Koch A, Høiby N. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *APMIS*. 2000;108:329-364.
154. Hartl D, Griesse M, Kappler M, et al. Pulmonary TH2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(1):204-211. doi:10.1016/j.jaci.2005.09.023

155. Li Y, Wei C, Xu H, et al. The immunoregulation of Th17 in host against intracellular bacterial infection. *Mediators of Inflammation*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/6587296
156. Liu J, Feng Y, Yang K, et al. Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2011;61(2):179-188. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00764.x
157. Lorè NI, Cigana C, Riva C, et al. IL-17A impairs host tolerance during airway chronic infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*. 2016;6. doi:10.1038/srep25937
158. Agak GW, Mouton A, Teles RMB, et al. Extracellular traps released by antimicrobial TH17 cells contribute to host defense. *Journal of Clinical Investigation*. 2021;131(2). doi:10.1172/JCI141594
159. Dubin PJ, Kolls JK. IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292:519-528. doi:10.1152/ajplung.00312.2006.-Patients
160. Tiringier K, Treis A, Fucik P, et al. A Th17-and Th2-skewed cytokine profile in cystic fibrosis lungs represents a potential risk factor for *pseudomonas aeruginosa* infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2013;187(6):621-629. doi:10.1164/rccm.201206-1150OC
161. Kell DB, Brown M, Davey HM, Dunn WB, Spasic I, Oliver SG. Metabolic footprinting and systems biology: The medium is the message. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(7):557-565. doi:10.1038/nrmicro1177
162. Christiane You Essoh. *Étude Épidémiologique de Souches de Pseudomonas Aeruginosa Responsables d'infections et de Leurs Bactériophages Pour Une Approche Thérapeutique*. Université Paris Sud - Paris XI; Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire); 2014.
163. Stover CK, Pham² XQ, Erwin AL, et al. *Complete Genome Sequence of Pseudomonas Aeruginosa PAO1, an Opportunistic Pathogen*. Vol 406.; 2000. www.nature.com
164. Wolfgang MC, Kulasekara BR, Liang X, et al. *Conservation of Genome Content and Virulence Determinants among Clinical and Environmental Isolates of Pseudomonas Aeruginosa*. www.Pseudomonas.com
165. Rossi E, Falcone M, Molin S, Johansen HK. High-resolution in situ transcriptomics of *Pseudomonas aeruginosa* unveils genotype independent patho-phenotypes in cystic fibrosis lungs. *Nature Communications*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-05944-5
166. Frimmersdorf E, Horatzek S, Pelnikevich A, Wiehlmann L, Schomburg D. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: A metabolomic approach. *Environmental Microbiology*. 2010;12(6):1734-1747. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02253.x
167. la Rosa R, Johansen HK, Molina S. Convergent metabolic specialization through distinct evolutionary paths in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*. 2018;9(2). doi:10.1128/mBio.00269-18

168. Markleya JL, Rafael Brüscheweilerb ASE, Hamid R. Eghbalniaa R, Powersd, Daniel Rafterye and DSW. The Future of NMR-Based Metabolomics. *Curr Opin Biotechnol*. 2017;176(1):139-148. doi:10.1016/j.copbio.2016.08.001.The
169. Marvig RL, Sommer LM, Molin S, Johansen HK. Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nature Genetics*. 2015;47(1):57-64. doi:10.1038/ng.3148
170. Chandler CE, Horspool AM, Hill PJ, et al. Genomic and phenotypic diversity among ten laboratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*. 2019;201(5). doi:10.1128/JB.00595-18
171. Dunphy LJ, Grimes KL, Wase N, Kolling GL, Papin JA. Untargeted Metabolomics Reveals Species-Specific Metabolite Production and Shared Nutrient Consumption by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *mSystems*. 2021;6(3). doi:10.1128/msystems.00480-21
172. Pierre Barbier Saint Hilaire. *Utilisation de La Métabolomique Pour l'étude de l'encéphalopathie Hépatique et Développement de Nouvelles Approches Pour l'acquisition de Données Par Spectrométrie de Masse*. Université Paris-Saclay; 2019.
173. Moyne O. *Approche Métabolomique Pour l'étude de l'évolution adaptative de Pseudomonas Aeruginosa Au Cours Desinfections Pulmonaires Chroniques Dans La Mucoviscidose*.
174. Yung YP, McGill SL, Chen H, Park H, Carlson RP, Hanley L. Reverse diauxie phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm revealed by exometabolomics and label-free proteomics. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2019;5(1). doi:10.1038/s41522-019-0104-7
175. Depke T, Thöming JG, Kordes A, Häussler S, Brönstrup M. Untargeted LC-MS metabolomics differentiates between virulent and avirulent clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomolecules*. 2020;10(7):1-21. doi:10.3390/biom10071041
176. Han ML, Zhu Y, Creek DJ, et al. Alterations of Metabolic and Lipid Profiles in Polymyxin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(6):1-14. doi:10.1128/AAC.02656-17
177. Hussein M, Han ML, Zhu Y, et al. Metabolomics Study of the Synergistic Killing of Polymyxin B in Combination with Amikacin against Polymyxin-Susceptible and-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Published online 2019. doi:10.1128/AAC
178. Quinn RA, Lim YW, Mak TD, et al. Metabolomics of pulmonary exacerbations reveals the personalized nature of cystic fibrosis disease. *PeerJ*. 2016;2016(8). doi:10.7717/peerj.2174
179. Silveira CB, Cobián-Güemes AG, Uranga C, et al. Multi-omics study of keystone species in a cystic fibrosis microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(21). doi:10.3390/ijms222112050
180. Michelsen CF, Khademi SMH, Johansen HK, Ingmer H, Dorrestein PC, Jelsbak L. Evolution of metabolic divergence in *Pseudomonas aeruginosa* during long-term infection facilitates a

- proto-cooperative interspecies interaction. *ISME Journal*. 2016;10(6):1330-1336. doi:10.1038/ismej.2015.220
181. Melnik A v., Vázquez-Baeza Y, Aksenov AA, et al. Molecular and Microbial Microenvironments in Chronically Diseased Lungs Associated with Cystic Fibrosis. *mSystems*. 2019;4(5). doi:10.1128/msystems.00375-19
 182. Whiteson K, Agrawal S, Agrawal A. Differential responses of human dendritic cells to metabolites from the oral/airway microbiome. *Clinical and Experimental Immunology*. 2017;188(3):371-379. doi:10.1111/cei.12943
 183. Quinn RA, Phelan V v., Whiteson KL, et al. Microbial, host and xenobiotic diversity in the cystic fibrosis sputum metabolome. *ISME Journal*. 2016;10(6):1483-1498. doi:10.1038/ismej.2015.207
 184. Quinn RA, Adem S, Mills RH, et al. Neutrophilic proteolysis in the cystic fibrosis lung correlates with a pathogenic microbiome. *Microbiome*. 2019;7(1). doi:10.1186/s40168-019-0636-3
 185. Vinayavekhin N, Saghatelian A. Regulation of alkyl-dihydrothiazole-carboxylates (ATCs) by iron and the pyochelin gene cluster in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chemical Biology*. 2009;4(8):617-623. doi:10.1021/cb900075n
 186. Zanella D, Liden T, York J, Franchina FA, Focant JF, Schug KA. Exploiting targeted and untargeted approaches for the analysis of bacterial metabolites under altered growth conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021;413(21):5321-5332. doi:10.1007/s00216-021-03505-2
 187. Ma Y, Shi Q, He Q, Chen G. Metabolomic insights into the inhibition mechanism of methyl N-methylanthranilate: A novel quorum sensing inhibitor and antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Food Microbiology*. 2021;358:109402. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109402
 188. Neerincx AH, Whiteson K, Phan JL, et al. Lumacaftor/ivacaftor changes the lung microbiome and metabolome in cystic fibrosis patients. *ERJ Open Research*. 2021;7(2):00731-02020. doi:10.1183/23120541.00731-2020
 189. Ramos KJ, Smith PJ, McKone EF, et al. Lung transplant referral for individuals with cystic fibrosis: Cystic Fibrosis Foundation consensus guidelines. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2019;18(3):321-333. doi:10.1016/j.jcf.2019.03.002
 190. Marthin JK, Petersen N, Skovgaard LT, Nielsen KG. Lung function in patients with primary ciliary dyskinesia: A cross-sectional and 3-decade longitudinal study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010;181(11):1262-1268. doi:10.1164/rccm.200811-1731OC
 191. Cameli P, Refini RM, Bergantini L, et al. Long-Term Follow-Up of Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis Treated With Pirfenidone or Nintedanib: A Real-Life Comparison Study. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020;7. doi:10.3389/fmolb.2020.581828

192. Donaldson GC, Seemungal TAR, Bhowmik A. *Relationship between Exacerbation Frequency and Lung Function Decline in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.*; 2002. www.thoraxjnl.com
193. Waters V, Stanojevic S, Atenafu EG, et al. Effect of pulmonary exacerbations on long-term lung function decline in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*. 2012;40(1):61-66. doi:10.1183/09031936.00159111
194. Chawla K, Vishwanath S, Mohan K. M, Lazer B. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* on exacerbation in patients with bronchiectasis. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2015;7(1):18-22. doi:10.4103/0974-777X.150885
195. Garcia-Clemente M, de la Rosa D, Máiz L, et al. Impact of *pseudomonas aeruginosa* infection on patients with chronic inflammatory airway diseases. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(12):1-32. doi:10.3390/jcm9123800
196. Lam JC, Somayaji R, Surette MG, Rabin HR, Parkins MD. Reduction in *Pseudomonas aeruginosa* sputum density during a cystic fibrosis pulmonary exacerbation does not predict clinical response. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15(1). doi:10.1186/s12879-015-0856-5
197. Martinez-García MA. *Pseudomonas aeruginosa* infection and exacerbations in bronchiectasis: More questions than answers. *European Respiratory Journal*. 2018;51(2). doi:10.1183/13993003.02497-2017
198. Trejo-Hernández A, Andrade-Domínguez A, Hernández M, Encarnación S. Interspecies competition triggers virulence and mutability in *Candida albicans*-*Pseudomonas aeruginosa* mixed biofilms. *ISME Journal*. 2014;8(10):1974-1988. doi:10.1038/ismej.2014.53
199. Paugam A, Baixench MT, Demazes-Dufeu N, et al. Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. *Medical Mycology*. 2010;48(O1). doi:10.3109/13693786.2010.503665
200. Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2003;2(1):29-34. doi:10.1016/S1569-1993(02)00141-8
201. Do G, Conway SP, Heijerman HGM, et al. *Antibiotic Therapy against Pseudomonas Aeruginosa in Cystic Fibrosis: A European Consensus*.
202. Hotterbeekx A, Kumar-Singh S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. In vivo and In vitro interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7(APR). doi:10.3389/fcimb.2017.00106
203. Hudson VL, Wielinski CL, Regelman WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *Journal of Pediatrics*. 1993;122(6):854-860. doi:10.1016/S0022-3476(09)90007-5

204. Ghimire JJ, Gulla KM, Jat KR, Sankar J, Lodha R, Kabra SK. Risk factors and clinical course of children with cystic fibrosis colonized with *Staphylococcus aureus*. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2021;115(7):801-806. doi:10.1093/trstmh/traa129
205. Stollar F, Adde FV, Cunha MT, Leone C, Rodrigues JC. Shwachman-Kulczycki score still useful to monitor cystic fibrosis severity. *Clinics*. 2011;66(6):979-983. doi:10.1590/S1807-59322011000600010
206. Briaud P, Bastien S, Camus L, et al. Impact of Coexistence Phenotype Between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates on Clinical Outcomes Among Cystic Fibrosis Patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10. doi:10.3389/fcimb.2020.00266
207. Hérivaux A, Willis JR, Mercier T, et al. Lung microbiota predict invasive pulmonary aspergillosis and its outcome in immunocompromised patients. *Thorax*. Published online 2021. doi:10.1136/thoraxjnl-2020-216179
208. McArdle AJ, Turkova A, Cunningham AJ. When do co-infections matter? *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2018;31(3):209-215. doi:10.1097/QCO.0000000000000447
209. Garza-Cuartero L, O'Sullivan J, Blanco A, et al. *Fasciola hepatica* infection reduces *Mycobacterium bovis* burden and mycobacterial uptake and suppresses the pro-inflammatory response. *Parasite Immunology*. 2016;38(7):387-402. doi:10.1111/pim.12326
210. Sharma-Kuinkel BK, Rude TH, Fowler VG. Pulse field gel electrophoresis. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 1373. Humana Press Inc.; 2016:117-130. doi:10.1007/7651_2014_191
211. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R v, et al. *GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing*. Vol 33.; 1995.
212. de Saint-Etienne Ph Berthelot Carricajo F Grattard A Ros CA. *Journées d'échanges Du Réseau BMR Sud-Est-24 Juin 2008 Apport de La Biologie Moléculaire Dans La Mise En Évidence de La Transmission Croisée*.
213. Nguyen AT, O'Neill MJ, Watts AM, et al. Adaptation of iron homeostasis pathways by a *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine mutant in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol*. 2014;196(12):2265-2276. doi:10.1128/JB.01491-14
214. Cornelis P, Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013;4(NOV). doi:10.3389/fcimb.2013.00075
215. Abu EA, Su S, Sallans L, et al. Cyclic voltammetric, fluorescence and biological analysis of purified aeruginosin A, a secreted red pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology (United Kingdom)*. 2013;159(8):1736-1747. doi:10.1099/mic.0.065235-0

216. Lozano C, Azcona-Gutiérrez JM, van Bambeke F, Sáenz Y. Great phenotypic and genetic variation among successive chronic *Pseudomonas aeruginosa* from a cystic fibrosis patient. *PLoS ONE*. 2018;13(9). doi:10.1371/journal.pone.0204167
217. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):403-434. doi:10.1128/CMR.19.2.403-434.2006
218. Hatzenbuehler J, Pulling TJ. Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician*. 2011;84(9):1027-1033.
219. O YQ, Reszka KJ, Spitz DR, Denning GM, Britigan BE, Britigan Pseudomonas BE. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287:94-103. doi:10.1152/ajplung.00025.2004.- Production
220. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*. 2004;10(12):599-606. doi:10.1016/j.molmed.2004.10.002
221. Baront SS, Rowe JJ. *Antibiotic Action of Pyocyanin*. Vol 20.; 1981.
222. Kerr JR, Taylor GW, Rutman A, Høiby N, Cole PJ, Wilson R. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of Clinical Pathology*. 1999;52(5):385-387. doi:10.1136/jcp.52.5.385
223. Allen L, Dockrell DH, Pattery T, et al. Pyocyanin Production by *Pseudomonas aeruginosa* Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host Defenses In Vivo . *The Journal of Immunology*. 2005;174(6):3643-3649. doi:10.4049/jimmunol.174.6.3643
224. Palmer KL, Aye LM, Whiteley M. Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(22):8079-8087. doi:10.1128/JB.01138-07
225. la Rosa R, Johansen HK, Molin S. Adapting to the airways: Metabolic requirements of *Pseudomonas aeruginosa* during the infection of cystic fibrosis patients. *Metabolites*. 2019;9(10). doi:10.3390/metabo9100234
226. Bertani G. Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *Journal of Bacteriology*. 2004;186(3):595-600. doi:10.1128/JB.186.3.595-600.2004
227. Kumar B, Cardona ST. Synthetic cystic fibrosis sputum medium regulates flagellar biosynthesis through the flhF gene in *Burkholderia cenocepacia*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2016;6(JUN). doi:10.3389/fcimb.2016.00065
228. Jaiyesimi OA, McAvoy AC, Fogg DN, Garg N. Metabolomic profiling of *Burkholderia cenocepacia* in synthetic cystic fibrosis sputum medium reveals nutrient environment-specific production of virulence factors. *Scientific Reports*. 2021;11(1). doi:10.1038/s41598-021-00421-4

229. Colmer-Hamood JA, Dzvova N, Kruczek C, Hamood AN. In Vitro Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Using Conditions That Mimic the Environment at Specific Infection Sites. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Vol 142. Elsevier B.V.; 2016:151-191. doi:10.1016/bs.pmbts.2016.05.003
230. Turner KH, Wessel AK, Palmer GC, Murray JL, Whiteley M. Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(13):4110-4115. doi:10.1073/pnas.1419677112
231. McGinnis MW, Parker ZM, Walter NE, Rutkovsky AC, Cartaya-Marin C, Karatan E. Spermidine regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation via transport and signaling pathways. *FEMS Microbiology Letters*. 2009;299(2):166-174. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01744.x
232. McGill SL, Yung Y, Hunt KA, Henson MA, Hanley L, Carlson RP. *Pseudomonas aeruginosa* reverse diauxie is a multidimensional, optimized, resource utilization strategy. *Scientific Reports*. 2021;11(1). doi:10.1038/s41598-020-80522-8
233. Choi Y, Park HY, Park SJ, et al. Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules and Cells*. 2011;32(1):57-65. doi:10.1007/s10059-011-2322-6
234. Yoon S il, Kurnasov O, Natarajan V, et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science (1979)*. 2012;335(6070):859-864. doi:10.1126/science.1215584
235. Blohmke CJ, Victor RE, Hirschfeld AF, et al. Innate Immunity Mediated by TLR5 as a Novel Antiinflammatory Target for Cystic Fibrosis Lung Disease. *The Journal of Immunology*. 2008;180(11):7764-7773. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7764
236. Calmeiro J, Mendes L, Duarte IF, et al. In-Depth Analysis of the Impact of Different Serum-Free Media on the Production of Clinical Grade Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2021;11. doi:10.3389/fimmu.2020.593363
237. D R Leach, M F Krummel, J P Allison. *Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade.*; 1996.
238. Ng Loke P', Allison JP. *PD-L1 and PD-L2 Are Differentially Regulated by Th1 and Th2 Cells.* www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0931259100
239. Patil NK, Luan L, Bohannon JK, Hernandez A, Guo Y, Sherwood ER. Frontline science: Anti-PD-L1 protects against infection with common bacterial pathogens after burn injury. *Journal of Leukocyte Biology*. 2018;103(1):23-33. doi:10.1002/JLB.5HI0917-360R
240. Gao Y, Chen L, Hou M, et al. TLR2 directing PD-L2 expression inhibit T cells response in *Schistosoma japonicum* infection. *PLoS ONE*. 2013;8(12). doi:10.1371/journal.pone.0082480
241. Colley DG, Sasser LE, Reed AM. *PD-L2+ Dendritic Cells and PD-1+ CD4+ T Cells in Schistosomiasis Correlate with Morbidity.* Vol 27.; 2005.

242. Mendoza-Coronel E, Camacho-Sandoval R, Bonifaz LC, López-Vidal Y. PD-L2 induction on dendritic cells exposed to Mycobacterium avium downregulates BCG-specific T cell response. *Tuberculosis*. 2011;91(1):36-46. doi:10.1016/j.tube.2010.11.008
243. Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, et al. Programmed Death (PD)-1:PD-Ligand 1/PD-Ligand 2 Pathway Inhibits T Cell Effector Functions during Human Tuberculosis. *The Journal of Immunology*. 2008;181(1):116-125. doi:10.4049/jimmunol.181.1.116
244. Liang SC, Greenwald RJ, Latchman YE, et al. PD-L1 and PD-L2 have distinct roles in regulating host immunity to cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Immunology*. 2006;36(1):58-64. doi:10.1002/eji.200535458
245. Stempin CC, Motrán CC, Aoki MP, Falcón CR, Cerbán FM, Cervi L. *PD-L2 Negatively Regulates Th1-Mediated Immunopathology during Fasciola Hepatica Infection*. Vol 7. www.impactjournals.com/oncotarget/
246. Karunaratne DS, Horne-Debets JM, Huang JX, et al. Programmed Death-1 Ligand 2-Mediated Regulation of the PD-L1 to PD-1 Axis Is Essential for Establishing CD4+ T Cell Immunity. *Immunity*. 2016;45(2):333-345. doi:10.1016/j.immuni.2016.07.017
247. Wikenheiser DJ, Stumhofer JS. ICOS co-stimulation: Friend or foe? *Frontiers in Immunology*. 2016;7(AUG). doi:10.3389/fimmu.2016.00304
248. Gao X, Gigoux M, Yang J, Leconte J, Yang X, Suh WK. Anti-Chlamydial Th17 Responses Are Controlled by the Inducible Costimulator Partially through Phosphoinositide 3-Kinase Signaling. *PLoS ONE*. 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0052657
249. Crompton PD, Pierce SK. PD-L2 Elbows out PD-L1 to Rescue T Cell Immunity to Malaria. *Immunity*. 2016;45(2):231-233. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.001
250. Kumar P, Bhaskar S. Analysis of T Cell Proliferating and Polarizing Potential of Murine Dendritic Cells in Allogeneic-mixed Leukocyte Reaction. *BIO-PROTOCOL*. 2016;6(5). doi:10.21769/bioprotoc.1750
251. Flaherty S, Reynolds JM. Mouse naïve CD4+ T cell isolation and in vitro differentiation into T cell subsets. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;2015(98). doi:10.3791/52739
252. vander Lugt B, Khan AA, Hackney JA, et al. Transcriptional programming of dendritic cells for enhanced MHC class II antigen presentation. *Nature Immunology*. 2014;15(2):161-167. doi:10.1038/ni.2795
253. Jin D, Sprent J. GM-CSF Culture Revisited: Preparation of Bulk Populations of Highly Pure Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow. *The Journal of Immunology*. 2018;201(10):3129-3139. doi:10.4049/jimmunol.1800031
254. Brassard J, Maheux C, Langlois A, et al. Lipopolysaccharide impacts murine CD103 + DC differentiation, altering the lung DC population balance. *European Journal of Immunology*. 2019;49(4):638-652. doi:10.1002/eji.201847910

255. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(12):948-958. doi:10.1038/nrmicro1289
256. Otto M. Staphylococcus aureus toxins. *Current Opinion in Microbiology*. 2014;17(1):32-37. doi:10.1016/j.mib.2013.11.004
257. Malachowa N, Kobayashi SD, Freedman B, Dorward DW, DeLeo FR. Staphylococcus aureus Leukotoxin GH Promotes Formation of Neutrophil Extracellular Traps . *The Journal of Immunology*. 2013;191(12):6022-6029. doi:10.4049/jimmunol.1301821
258. Malachowa N, Kobayashi SD, Braughton KR, et al. Staphylococcus aureus leukotoxin GH promotes inflammation. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;206(8):1185-1193. doi:10.1093/infdis/jis495
259. Pernet E, Guillemot L, Burgel PR, et al. Pseudomonas aeruginosa eradicates Staphylococcus aureus by manipulating the host immunity. *Nature Communications*. 2014;5. doi:10.1038/ncomms6105
260. Camus L, Briaud P, Vandenesch F, Moreau K. How Bacterial Adaptation to Cystic Fibrosis Environment Shapes Interactions Between Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12. doi:10.3389/fmicb.2021.617784
261. Tiringier K, Treis A, Fucik P, et al. A Th17-and Th2-skewed cytokine profile in cystic fibrosis lungs represents a potential risk factor for pseudomonas aeruginosa infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2013;187(6):621-629. doi:10.1164/rccm.201206-1150OC
262. Hadadi N, Pandey V, Chiappino-Pepe A, et al. Mechanistic insights into bacterial metabolic reprogramming from omics-integrated genome-scale models. *npj Systems Biology and Applications*. 2020;6(1). doi:10.1038/s41540-019-0121-4
263. Demissie ZA, Witte T, Robinson KA, et al. Transcriptomic and Exometabolomic Profiling Reveals Antagonistic and Defensive Modes of Clonostachys rosea Action against Fusarium graminearum. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2020;33(6):842-858. doi:10.1094/MPMI-11-19-0310-R
264. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*. 2010;11. doi:10.1186/1471-2105-11-395
265. Tautenhahn R, Bottcher C, Neumann S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics*. 2008;9. doi:10.1186/1471-2105-9-504
266. Kanehisa M, Goto S. *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Vol 28.; 2000. <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
267. Huang W, Brewer LK, Jones JW, et al. PAMDB: A comprehensive Pseudomonas aeruginosa metabolome database. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(D1):D575-D580. doi:10.1093/nar/gkx1061

268. Perla-Kaján J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids*. 2007;32(4):561-572. doi:10.1007/s00726-006-0432-9
269. Lash LH, Elfarra AA, Anders MW. *S-(1,2-Dichlorovinyl)-L-Homocysteine-Induced Cytotoxicity in Isolated Rat Kidney Cells*. Vol 251.; 1986.
270. Lin N, Qin S, Luo S, Cui S, Huang G, Zhang X. Homocysteine induces cytotoxicity and proliferation inhibition in neural stem cells via DNA methylation in vitro. *FEBS Journal*. 2014;281(8):2088-2096. doi:10.1111/febs.12764
271. Nakanishi T, Akabane ER, Nanami M, et al. Comparison of cytotoxicity of cysteine and homocysteine for renal epithelial cells. *Nephron Exp Nephrol*. 2005;100(1). doi:10.1159/000084108
272. Liu CC, Ho WY, Leu KL, Tsai HM, Yang TH. *Effects of S-Adenosylhomocysteine and Homocysteine on DNA Damage and Cell Cytotoxicity in Murine Hepatic and Microglia Cell Lines*. Vol 23. Wiley Periodicals, Inc; 2009. www.interscience.wiley.com
273. Perna AF, Ingrosso D, Lombardi C, et al. *Possible Mechanisms of Homocysteine Toxicity*. Vol 63.; 2003.
274. Fiermonte G, Dolce V, Palmieri L, et al. Identification of the human mitochondrial oxodicarboxylate carrier. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal location. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(11):8225-8230. doi:10.1074/jbc.M009607200
275. Boczonadi V, King MS, Smith AC, et al. *Mitochondrial Oxodicarboxylate Carrier Deficiency Is Associated with Mitochondrial DNA Depletion and Spinal Muscular Atrophy-like Disease*.
276. Ryall B, Davies JC, Wilson R, Shoemark A, Williams HD. Pseudomonas aeruginosa, cyanide accumulation and lung function in CF and non-CF bronchiectasis patients. *European Respiratory Journal*. 2008;32(3):740-747. doi:10.1183/09031936.00159607
277. Delacour H, Servonnet A, Perrot A, Vigezzi JF, Ramirez JM. *La Courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) : Principes et Principales Applications En Biologie Clinique*.
278. Stanier RY, Tsuchida M. *THE BACTERIAL OXIDATION OF TRYPTOPHAN I. A GENERAL SURVEY OF THE PATHWAYS*1.
279. Söderholm A, Newton MS, Patrick WM, Selmer M. Structure and kinetics of indole-3-glycerol phosphate synthase from pseudomonas aeruginosa: Decarboxylation is not essential for indole formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(47):15948-15956. doi:10.1074/jbc.RA120.014936
280. Gutiérrez-Vázquez C, Quintana FJ. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*. 2018;48(1):19-33. doi:10.1016/j.immuni.2017.12.012
281. Wei P, Hu GH, Kang HY, et al. An aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress the Th17 response in allergic rhinitis patients. *Laboratory Investigation*. 2014;94(5):528-535. doi:10.1038/labinvest.2014.8

282. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, et al. Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2008;453(7191):65-71. doi:10.1038/nature06880
283. de Araújo EF, Preite NW, Veldhoen M, Loures FV, Calich VLG. Pulmonary paracoccidioidomycosis in AhR deficient hosts is severe and associated with defective Treg and Th22 responses. *Scientific Reports*. 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-68322-6
284. Quintana FJ, Sherr DH. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacological Reviews*. 2013;65(4):1148-1161. doi:10.1124/pr.113.007823
285. Lee JH, Wood TK, Lee J. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends in Microbiology*. 2015;23(11):707-718. doi:10.1016/j.tim.2015.08.001
286. Lee J, Attila C, Cirillo SLG, Cirillo JD, Wood TK. Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microbial Biotechnology*. 2009;2(1):75-90. doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00061.x
287. Hu M, Zhang C, Mu Y, Shen Q, Feng Y. Indole Affects Biofilm Formation in Bacteria. *Indian Journal of Microbiology*. 2010;50(4):362-368. doi:10.1007/s12088-011-0142-1
288. Rabelo TK, Guimarães AG, Oliveira MA, et al. Shikimic acid inhibits LPS-induced cellular pro-inflammatory cytokines and attenuates mechanical hyperalgesia in mice. *International Immunopharmacology*. 2016;39:97-105. doi:10.1016/j.intimp.2016.07.016
289. Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, et al. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell*. 2016;167(3):829-842.e13. doi:10.1016/j.cell.2016.09.031
290. Usher LR, Lawson RA, Geary I, et al. Induction of Neutrophil Apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Pyocyanin: A Potential Mechanism of Persistent Infection . *The Journal of Immunology*. 2002;168(4):1861-1868. doi:10.4049/jimmunol.168.4.1861
291. Marreiro de Sales-Neto J, Lima A, Cavalcante-Silva LHA, Vasconcelos U, Rodrigues-Mascarenhas S. Anti-inflammatory potential of pyocyanin in LPS-stimulated murine macrophages. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2019;41(1):102-108. doi:10.1080/08923973.2018.1555845
292. Moura-Alves P, Faé K, Houthuys E, et al. AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. *Nature*. 2014;512(7515):387-392. doi:10.1038/nature13684
293. Look DC, Stoll LL, Romig SA, Humlicek A, Britigan BE, Denning GM. Pyocyanin and Its Precursor Phenazine-1-Carboxylic Acid Increase IL-8 and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Human Airway Epithelial Cells by Oxidant-Dependent Mechanisms. *The Journal of Immunology*. 2005;175(6):4017-4023. doi:10.4049/jimmunol.175.6.4017
294. Denning GM, Wollenweber LA, Railsback MA, Cox CD, Stoll LL, Britigan BE. *Pseudomonas Pyocyanin Increases Interleukin-8 Expression by Human Airway Epithelial Cells*. Vol 66.; 1998.

295. Voggu L, Schlag S, Biswas R, Rosenstein R, Rausch C, Götz F. Microevolution of cytochrome bd oxidase in staphylococci and its implication in resistance to respiratory toxins released by *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*. 2006;188(23):8079-8086. doi:10.1128/JB.00858-06
296. Ran H, Hassett DJ, Lau GW, Ausubel FM. *Human Targets of Pseudomonas Aeruginosa Pyocyanin*.; 2003. www.ncbi.nlm.nih.gov
297. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infection and Immunity*. 2004;72(7):4275-4278. doi:10.1128/IAI.72.7.4275-4278.2004
298. Liu GY, Nizet V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*. 2009;17(9):406-413. doi:10.1016/j.tim.2009.06.006
299. Denning GM, Iyer SS, Reszka KJ, O'Malley Y, Rasmussen GT, Britigan BE. Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2003;285(3 29-3). doi:10.1152/ajplung.00086.2003
300. Riquelme SA, Prince A. Airway immunometabolites fuel *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Respiratory Research*. 2020;21(1). doi:10.1186/s12931-020-01591-x
301. Michie KL, Dees JL, Fleming D, et al. Role of *Pseudomonas aeruginosa* Glutathione Biosynthesis in Lung and Soft Tissue Infection. Published online 2020. doi:10.1128/IAI
302. Wongsaroj L, Saninjuk K, Romsang A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* glutathione biosynthesis genes play multiple roles in stress protection, bacterial virulence and biofilm formation. *PLoS ONE*. 2018;13(10). doi:10.1371/journal.pone.0205815
303. Zhou H, Wang M, Smalley NE, et al. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by glutathione. *Journal of Bacteriology*. 2019;201(9). doi:10.1128/JB.00685-18
304. Vijayrajratnam S, Pushkaran AC, Balakrishnan A, Vasudevan AK, Biswas R, Mohan CG. Bacterial peptidoglycan with amidated meso-diaminopimelic acid evades NOD1 recognition: An insight into NOD1 structure-recognition. *Biochemical Journal*. 2016;473(24):4573-4592. doi:10.1042/BCJ20160817
305. Caruso R, Warner N, Inohara N, Núñez G. NOD1 and NOD2: Signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity*. 2014;41(6):898-908. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.010
306. Liu M, Wang X, Wang L, et al. Targeting the IDO1 pathway in cancer: From bench to bedside. *Journal of Hematology and Oncology*. 2018;11(1). doi:10.1186/s13045-018-0644-y

Liste des communications affichées et orales

Posters :

- Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM), 2021 : « *Pseudomonas aeruginosa-derived metabolites modulate immunity and correlate with respiratory functions in Cystic Fibrosis patients* ».
- Congrès de la Société Française d'Immunologie (SFI) 2021 « *Immuno-Metabolite discovery: study of metabolic adaptation of Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis (CF) patients* ».
- Journée du département de Chimie Biologie Santé, 2019 : « *Metabolic adaptation of Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis patients : immunometabolites discovery* ».
- Journée de la recherche médicale, 2019 : « *Immuno-Metabolite discovery: study of metabolic adaptation of Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis patients* ».

Communications orales :

- Congrès de la Société Française d'Immunologie 2021 « *Immuno-Metabolite discovery: study of metabolic adaptation of Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis (CF) patients* ».
- Colloque Host-Pathogen, Grenoble, 2021 « *Pseudomonas aeruginosa-derived metabolites modulate immunity and correlate with respiratory functions in Cystic Fibrosis patients* ».
- Congrès du Réseau Francophone de Métabolisme et Fluxomique (RFMF), 2021 « *Immunometabolites discovery: study of metabolic adaptation of Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis patients* ».
- Colloque Pseudomonas, 2021 « *Pseudomonas aeruginosa-derived metabolites modulate immunity and correlate with respiratory functions in Cystic Fibrosis patients* ».
- Congrès du Groupe Régional de Recherche en Microbiologie et Interactions (G-RREMI), 2020 « *Immuno-Metabolite discovery: Study of metabolic adaptation of Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis patients* ».
- Colloque Pseudomonas, 2019 : « *Evolution métabolique de Pseudomonas aeruginosa chez les patients atteints de mucoviscidose* ».
- Congrès, Collège National de Biochimie et Biologie Moléculaire Médicale (CNBBMM), 2018 : « *Métabolites immunomodulateurs et application au développement d'immunothérapies* ».

Abstract

Background and objectives:

During chronic patient's infection, bacteria will adapt themselves to the pulmonary environment and especially to the immune system by secreting or expressing a multitude of pro / anti-inflammatory molecules. Among them, some metabolites, i.e. immunometabolites, have been described as altering the activation and the polarization of subsequent immune responses. To improve the knowledge on host/microbe crosstalk and to identify new immunometabolites, we have investigated the modulation of the immune system induced by clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) isolated from chronically infected CF patients.

Material & Methods:

Thirty two CF patients were included in the study and for each patient 2 isolates were collected 5 years apart. The supernatant of the strains were collected to analyze the modulation of the activation/maturation of dendritic cells (DC) under TLR activation induced by the excreted metabolites. To confirm these results, we evaluated T cell (LT) polarization *in vitro* and then in mice infected by strains with different immunomodulatory properties. In parallel, SN metabolic profiles were characterized by LC-MS/MS analysis. Then, to identify metabolites responsible of immunomodulations, we correlated both results. The immunomodulatory properties of the identified candidate metabolites were validated via an *in vitro* T cell polarization assay. Finally, we performed a proof of concept of this immunity modulation induced in vivo by the strains via the administration of metabolites or exometabolomes with immunomodulatory properties opposite to those of the delivered bacteria.

Results :

Interestingly, 3 different immunomodulatory profiles depending on strains were highlighted: two immunostimulatory clusters (depending on expression of PD-L2) and one immunosuppressive cluster (inhibiting DC maturation). Of note, infection of patients by immunosuppressive strains correlates with the decline of respiratory functions. These results were confirmed by LT polarization *in vitro* and in an infectious murine model showing an induction of a Th17 immune response mediated by the immunostimulatory strains and a Treg response by the immunosuppressive strains. Untargeted metabolomics analyses of bacterial SN showed 3 distinct metabolic fingerprints, highlighting the importance of Pa strains metabolism in the modulation of immunity. We identified immunomodulatory metabolites closely associated with immunoclusters and validated their immunomodulatory properties. Finally, we were able to show that the Th17 response inducing by immunostimulatory strains could be inhibited by the delivery of immunosuppressive metabolites or restored by exometabolome containing immunostimulatory metabolites during infection with immunosuppressive strains.

Conclusion :

This study demonstrate that bacteria are able to modulate host immunity through metabolites secretion upon infection. This highlighted a link between metabolic profiles, immunomodulatory properties of the strains and subsequent clinical outcome of patients. Some of the identified metabolites thus constitute new therapeutic targets for restoring/enhancing host immunity in chronic infectious diseases. This study provides a full process combining immunoassays and metabolomics for studying host/microbe dialogue and demonstrate its feasibility and relevance.

Résumé

Introduction

En contexte d'infection chronique, les bactéries vont s'adapter à l'environnement pulmonaire du patient et à la pression exercée par le système immunitaire en sécrétant ou en exprimant une multitude de molécules pro ou anti-inflammatoires. Parmi celles-ci, certains métabolites, ou immunométabolites, ont été décrits comme altérant l'activation et la polarisation des réponses immunitaires subséquentes. Pour améliorer les connaissances sur l'interaction hôte/pathogène et identifier des immunométabolites, nous étudions la modulation du système immunitaire induite par des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) isolées de patients atteints de mucoviscidose et chroniquement infectés.

Matériel et méthode

Trente-deux patients ont été inclus dans l'étude et, pour chaque patient, 2 isolats ont été recueillis à environ 5 ans d'intervalle. Les surnageants (SN) des souches ont été recueillis pour analyser la modulation de l'activation et de la maturation des cellules dendritiques (CD) sous l'activation TLR, induite par les métabolites excrétés. Ces résultats ont été confirmés sur la polarisation des Lymphocytes T (LT) *in vitro* puis chez des souris infectées par des souches ayant des propriétés immunomodulatrices différentes. En parallèle, les profils métaboliques des SN ont été caractérisés par analyse LC-MS/MS. Les métabolites responsables des immunomodulations observées ont été identifiés en corrélant les résultats de ces 2 approches. Les propriétés immunomodulatrices des métabolites identifiés ont été validées sur la polarisation des LT *in vitro*. Enfin, nous avons réalisé une preuve de concept de la modulation de l'immunité induite par les souches *in vivo* par l'apport de métabolites ou d'exométabolomes aux propriétés immunomodulatrices opposées à celles de la bactérie administrée.

Résultats

Les souches cliniques présentaient 3 profils immunomodulateurs : 2 clusters immunostimulants (différenciés par une expression variable du PD-L2) et 1 cluster immunosuppresseur (inhibition de la maturation des CD). L'infection des patients par des souches immunosuppressives a été corrélée au déclin et à l'instabilité des fonctions respiratoires au cours du temps. Ces résultats ont été confirmés par la polarisation de LT *in vitro* et *in vivo* montrant l'induction d'une réponse immunitaire Th17 par les souches immunostimulantes et Treg par les souches immunosuppressives. La corrélation entre la caractérisation par métabolomique des SN bactériens et les clusters immunologiques a permis de mettre en évidence des empreintes métaboliques distinctes soulignant l'importance du métabolisme des souches dans cette modulation. Des métabolites immunomodulateurs associés aux immunoclusters ont été identifiés et leurs propriétés ont été validées sur la polarisation de LT *in vitro*. Enfin, nous avons pu montrer que la réponse Th17 induite par les souches immunostimulantes pouvait être inhibée par l'apport de métabolites immunosuppresseurs et restaurées au cours de l'infection par les souches immunosuppressives par l'apport d'exométabolome immunostimulant.

Conclusion

Cette étude démontre que les bactéries pathogènes sont capables de moduler l'immunité de l'hôte par la sécrétion de métabolites au cours d'une infection chronique. Un lien a pu être mis en évidence entre les propriétés immunomodulatrices des souches, leur profil métabolique et leur impact sur l'évolution de l'état de santé des patients au cours du temps. Les métabolites identifiés constituent des cibles thérapeutiques pour restaurer/renforcer l'immunité de l'hôte dans les infections chroniques à Pa.