



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**



Université Lille Nord de France  
Pôle de Recherche  
et d'Enseignement Supérieur



Centre Hospitalier Régional  
Universitaire de Lille



RÉGION  
NORD  
PAS DE CALAIS

# **UNIVERSITE LILLE 2 - DU DROIT ET DE LA SANTE**

## **ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE**

### **THESE D'UNIVERSITE**

Discipline : Maladies Infectieuses

Présentée et soutenue par Emmanuel FAURE

## **Implications de la reconnaissance de *Pseudomonas aeruginosa* par le NLRC4-Inflammasome**

Thèse dirigée par Mme le Professeur Karine FAURE et M. le Docteur Eric KIPNIS

Soutenue publiquement le : Mardi 10 décembre 2013 à 18h00

Président : Monsieur le Professeur Benoît GUERY

Rapporteurs : Madame le Professeur Françoise VAN BAMBEKE

Madame le Docteur Sophie DE BENTZMANN

*A Perrine,*

*A mes parents, A Cécile,*

# Table des matières

Remerciements : .....	11
Partie 1 : Introduction .....	13
<b>Chapitre 1 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>13</b>
1) Caractéristiques .....	13
2) En pathologie humaine .....	13
3) Les principaux facteurs de virulence .....	14
4) La souche CHA .....	24
<b>Chapitre 2 : Généralités sur l'immunité innée pulmonaire.....</b>	<b>25</b>
1) La réponse alvéolaire chez la souris : Généralités .....	25
2) réponse innée, réponse adaptative .....	25
3) Organisation de l'immunité innée des voies respiratoires .....	26
4) Le rôle des pattern recognition receptors (PRRs) .....	26
<b>Chapitre 3 : Les inflammasomes dans l'immunité innée.....</b>	<b>27</b>
1) Généralités .....	27
2) Les Nod-like récepteurs (NLR).....	28
3) La pyroptose.....	29
4) IL-1 $\beta$ et IL-18 .....	31
5) Implications des NLR et de l'inflammasome en pathologie humaine .....	32
6) Le NLRC4-inflammasome .....	33
<b>Chapitre 4 : La voie Th17 : la réponse transitionnelle.....</b>	<b>37</b>
1) Généralités .....	37
2) Types cellulaires impliqués dans la production de cytokines de la voie Th17 .....	40
3) Voie Th17 au cours des infections bactériennes pulmonaires.....	41
4) Voie Th17 et infection pulmonaire à <i>P. aeruginosa</i> .....	43
5) Voie Th17 et peptides antimicrobiens.....	43
<b>Chapitre 5 : Les peptides antimicrobiens .....</b>	<b>44</b>
1) Généralités .....	44
2) Les cathélicidines .....	45
3) Les $\alpha$ -défensines et les $\beta$ -défensines.....	45
4) Peptides antimicrobiens humains et peptides antimicrobiens murins .....	46
5) Les peptides antimicrobiens dans l'immunité pulmonaire. ....	46
<b>Chapitre 6 : Une réponse immune adaptée et contrôlée détermine le pronostic de l'hôte</b> .....	<b>47</b>

1) La théorie dommage-réponse : « The damage-response framework of microbial pathogenesis ».....	47
2) Le syndrome de détresse respiratoire aiguë : Acute Lung Injury.....	48
<b>Chapitre 7 : Objectifs de ce travail .....</b>	<b>51</b>
Partie 2 : Matériels et Méthodes.....	52
<b>Chapitre 1 : Souches, plasmides et oligonucléotides .....</b>	<b>52</b>
1) Souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	52
2) Souche de <i>Escherichia coli</i> .....	54
3) Conditions de culture des bactéries et conservation.....	54
4) Antibiotiques utilisés : .....	55
5) Plasmides et vecteurs.....	55
<b>Chapitre 2 : Techniques de biologie moléculaire .....</b>	<b>56</b>
1) La polymérisation en chaîne (PCR).....	56
2) Électrophorèse de l'ADN.....	56
3) Extraction sur gel des fragments d'ADN .....	57
4) Digestion enzymatique .....	57
5) Clonage .....	57
6) Transformation des souches d' <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> .....	58
7) Préparation de l'ADN plasmidique.....	58
8) Dosage des acides nucléiques obtenus.....	58
<b>Chapitre 3 : Mutagénèse par échange allélique.....</b>	<b>59</b>
1) Échange allélique .....	59
2) La conjugaison biparentale .....	60
3) Sélection des clones double recombinant .....	60
4) Excision de la cassette de résistance .....	61
6) Mutagénèse tri-parentale : obtention de souche exprimant la Green fluorescent protein (GFP) .....	61
<b>Chapitre 4 : Modèle murin d'infection pulmonaire.....</b>	<b>62</b>
1) Animaux .....	62
2) Instillations intra-nasales.....	62
3) Inocula bactériens des différents modèles .....	62
4) Thérapeutiques utilisées <i>in vivo</i> .....	63
5) Mise à mort des souris.....	64
6) Modèle de survie à 96 heures.....	64
7) Modèle d'agression pulmonaire aiguë.....	65
<b>Chapitre 5 : Analyse de la réponse de l'hôte <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> .....</b>	<b>66</b>

1) Numération formule sur liquide de lavage broncho-alvéolaire. ....	66
2) Mesures de la sécrétion de cytokines par Méthode ELISA.....	66
3) Mesures de l'expression des transcrits par PCR quantitative .....	67
2) Analyses de la réponse cellulaire par Cytométrie en flux .....	70
<b>Chapitre 6 : Étude de la réponse de l'hôte <i>in-vitro</i> .....</b>	<b>72</b>
1) Collection et culture des macrophages péritonéaux .....	72
2) Analyse de la cytotoxicité .....	73
3) Dosage des cytokines dans les surnageants de macrophages par méthode ELISA.....	73
4) Western-Blot Caspase-1 inactive (p45) et caspase-1 activée (p10).....	74
5) Microscopie confocale : Analyse de la pyroptose.....	75
6) Cytométrie en flux : marquage de la caspase-1.....	75
<b>Chapitre 7 : Analyses statistiques .....</b>	<b>76</b>
<b>Partie 3 : Résultats .....</b>	<b>77</b>
<b>Chapitre 1 : Choix de la souche de <i>P. aeruginosa</i> et du NLR d'intérêt.....</b>	<b>77</b>
1) Choix de la souche de <i>P. aeruginosa</i> .....	77
2) Choix du Nod-like récepteurs (NLR) d'intérêt .....	80
<b>Chapitre 2 : L'activation du NLRC4-inflammasome par le SST3 inhibe les défenses antibactériennes de l'hôte .....</b>	<b>87</b>
1) Effet délétère de l'activation du NLRC4-inflammasome par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i> , indépendamment des exotoxines.....	87
2) La voie Th17 est activée chez les souris <i>Nlrc4</i> <sup>-/-</sup> .....	90
3) La réponse Th17 conduit à l'expression de peptides antimicrobiens.....	92
4) L'IL-18 réprime la réponse Th17 .....	96
5) Le modèle d'agression pulmonaire aiguë nécessite un inoculum bactérien suffisant.....	98
<b>Chapitre 3 : Intérêt de l'inflammasome au cours des infections à <i>P. aeruginosa</i> n'exprimant pas de système de sécrétion de type III (T3SS-). .....</b>	<b>99</b>
1) Le NLRC4 inflammasome participe à la clairance bactérienne pulmonaire des souches T3SS- .....	99
2) L'absence d'un SST3 fonctionnel augmente l'internalisation des bactéries dans les macrophages de l'hôte.....	101
3) L'expression de peptides antimicrobiens ne permet pas la clairance de la souche intracellulaire CHAΔpopBD dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë .....	103
<b>Chapitre 4 : La protéine FliC du flagelle participe à la clairance des souches extracellulaires et intracellulaires de <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>105</b>
1) FliC permet la reconnaissance de la souche T3SS- par le NLRC4-inflammasome in vivo .....	105

2) La reconnaissance du flagelle par TLR5 participe à la réponse Th17 et à la clairance bactérienne des souches T3SS+ .....	107
<b>Chapitre 5 : L'inhibition de l'inflammasome : cible thérapeutique ? .....</b>	<b>109</b>
1) Intérêt de l'inhibition du NLRC4-inflammasome par un anticorps anti-PKC $\delta$ .....	110
2) Intérêt de l'inhibition du NLRC4-inflammasome par la Colistine (Polymyxine E) .....	113
3) Intérêt de l'inhibition du NLRC4-inflammasome par l'IL-18BP .....	114
<b>Chapitre 6 : Les ratios IL-1<math>\beta</math>/IL-17 et IL-18/17 : Des biomarqueurs pour faciliter l'indication de thérapeutique adjuvante spécifique ? .....</b>	<b>116</b>
1) Évaluation des ratios avec la souche CHA .....	117
2) Évaluation des ratios avec la souche PAK .....	119
Discussion : .....	122
1) <i>P. aeruginosa</i> détourne la réponse de l'hôte .....	122
2) Rôle différentiel des « sensors » du flagelle : NLRC4 et TLR5 .....	123
3) L'IL-18 est délétère mais l'IL-1 $\beta$ semble nécessaire à la clairance de <i>P. aeruginosa</i> au cours de l'infection pulmonaire aiguë .....	124
4) L'immunomodulation de l'interaction délétère hôte-pathogène .....	125
5) La réponse de l'hôte comme biomarqueur dans l'indication des biothérapies ciblées..	126
Publications : .....	128
1) Articles Scientifiques .....	128
2) Communications orales congrès internationaux .....	128
3) Communications orales congrès nationaux .....	129
Bibliographie : .....	130
Résumé : .....	146

## Table des Figures

Figure 1 : Les systèmes de sécrétion de <i>P. aeruginosa</i>	15
Figure 2 : Le système de sécrétion de type III (SST3)	17
Figure 3 : KB001A : un anticorps anti-PcrV	21
Figure 4 : Le flagelle de <i>P. aeruginosa</i> et son analogie au SST3	22
Figure 5 : Principaux facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	23
Figure 6 : Les Nod-Like Récepteurs et leur mécanisme d'activation	28
Figure 7 : La pyroptose : une mort cellulaire pro-inflammatoire exposant les pathogènes intracellulaires au système immunitaire.	30
Figure 8 : Structure et activation du NLRC4-inflammasome.	33
Figure 9 : Les différentes polarisations des cellules T et l'activation de la voie Th17.	37
Figure 10 : La courbe dommage-réponse de l'interaction hôte-pathogène	48
Figure 11 : Mécanismes impliqués dans la lésion pulmonaire aiguë (ALI)	50
Figure 12 : Cartographies des plasmides pEX100Tlink et pUCGmlox	60
Figure 13 : Expression de NLRC4 dans différents types cellulaires	78
Figure 14 : Comparaison de la cytotoxicité et de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ induites par différentes souches de <i>P. aeruginosa</i> sur les macrophages pulmonaires et péritonéaux	79
Figure 15 : Implication de la reconnaissance d'un SST3 fonctionnel par NLRC4.	81
Figure 16 : Le SST3 de la souche CHA active le NLRC4-inflammasome.	82
Figure 17 : Le SST3 induit la mort cellulaire pyroptotique des macrophages	83
Figure 18 : Implication de NLRP6 et NLRP12 dans la reconnaissance de <i>P. aeruginosa</i>	84
Figure 19 : Intérêt de la reconnaissance de <i>P. aeruginosa</i> T3SS+ (souche CHA) par NLRC4, NLRP6 et NLRP12 dans un modèle de survie à 96 heures	85
Figure 20 : Évaluation de la reconnaissance de <i>P. aeruginosa</i> (souche CHA) par NLRC4 et NLRP6	86
Figure 21 : Analyse de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë comparant des souris <i>Wt</i> et <i>Nlrc4</i> <sup>-/-</sup>	88
Figure 22 : Formule des LBA et des cellules pulmonaires totales par Cytométrie en flux	89
Figure 23 : La réponse immune innée pulmonaire des souris <i>Nlrc4</i> <sup>-/-</sup> implique l'IL-17A et l'IL-22	94
Figure 24 : Spécificité du marquage intracellulaire de l'IL-23 en cytométrie en flux	91
Figure 25 : Analyse par cytométrie en flux des cellules productrices d'IL-17A/ROR $\gamma$ T et d'IL-23 dans les LBA et les cellules pulmonaires totales des souris <i>Wt</i> et <i>Nlrc4</i> <sup>-/-</sup> dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë	92
Figure 26 : Impact de l'antagonisation de la voie Th17 par un anticorps anti-IL-17A dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë avec la souche CHA (T3SS+)	93
Figure 27 : Mesure de l'expression des peptides antimicrobiens pulmonaires par PCR quantitative	95
Figure 28 : La sécrétion d'IL-18 par le NLRC4-inflammasome réprime la sécrétion d'IL-17A	96
Figure 29 : Impact de l'IL-18 dans l'agression pulmonaire aiguë avec la souche CHA (T3SS+)	97
Figure 30 : Un inoculum insuffisant n'entraîne pas de lésion pulmonaire ni d'activation du NLRC4-inflammasome	99

Figure 31 : Analyse de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë comparant souris <i>Wt</i> et <i>Nlrc4</i> <sup>-/-</sup> infectées avec la souche CHAΔpopBD (T3SS-)	100
Figure 32 : L'absence d'un SST3 fonctionnel augmente l'internalisation de <i>P. aeruginosa</i>	102
Figure 33 : Analyse de l'activation de la caspase-1 par la souche T3SS+ (CHA) par cytométrie en flux	103
Figure 34 : Impact de l'antagonisation de la voie Th17 par un anticorps anti-IL-17A dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë avec la souche T3SS-	104
Figure 35 : Expression des peptides antimicrobiens lors d'une infection pulmonaire avec la souche T3SS-	105
Figure 36 : Intérêt de la reconnaissance du flagelle par le NLRC4-inflammasome dans un modèle murin d'agression pulmonaire avec la souche T3SS-ΔFliC (CHAΔpopBDΔFliC)	106
Figure 37 : Implication de TLR5 dans la reconnaissance du flagelle et de l'activation de la voie Th17 au cours des infections pulmonaires avec la souche extracellulaire T3SS+ et intracellulaire T3SS-	108
Figure 38 : Thérapeutique inhibitrice du NLRC4-inflammasome	110
Figure 39 : Intérêt de l'inhibition du NLRC4-inflammasome par un anticorps anti-PKCδ dans une pneumonie aiguë avec la souche T3SS+	111
Figure 40 : Analyse de l'expression des peptides antimicrobiens inductibles, du TNFα, KC et de l'IL-6	112
Figure 41 : Intérêt de l'inhibition du NLRC4-inflammasome par la colistine (polymyxine E)	114
Figure 42 : Intérêt de l'inhibition du NLRC4-inflammasome par l'IL-18BP dans un modèle murin d'agression pulmonaire avec la souche T3SS+ (CHA)	115
Figure 43 : Analyse de l'expression des peptides antimicrobiens, du TNFα, KC et de l'IL-6	116
Figure 44 : Analyse cinétique de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë avec les souches T3SS+ et T3SS-	118
Figure 45 : Ration IL-1β/IL-17 et IL-18/IL-17 pour différencier les souches T3SS+ (CHA) et T3SS- (CHAΔpopBD)	119
Figure 46 : Analyse cinétique de la réponse de l'hôte dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë avec une souche T3SS+ (PAKΔSTY) et T3SS- (PAKΔPscf)	120
Figure 47 : Ratio IL-1β/IL-17 et IL-18/IL-17 pour différencier les souches T3SS+ (PAKΔSTY) et T3SS- (PAKΔPscf)	120



Tableau 1 : Caractéristiques du SST3 et du flagelle des souches de <i>P. aeruginosa</i>	53
Tableau 2 : Souches mutantes de CHA obtenues par mutagenèse plasmidique	54
Tableau 3 : Souches d' <i>E. coli</i> utilisées pour les échanges alléliques	54
Tableau 4 : Principaux antibiotiques utilisés	55
Tableau 5 : Principaux plasmides utilisés pour les mutants de délétion	55
Tableau 6 : Inocula des souches utilisés dans les modèles murins	63
Tableau 7 : Thérapeutiques immunomodulatrices utilisées dans les modèles in vivo	64
Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour l'analyse des transcrits par PCR quantitative	69
Tableau 9 : Caractéristiques des fluorochromes utilisés en microscopie confocale	75
Tableau 10 : Caractéristiques des fluorochromes utilisés pour l'analyse in vitro	76
Tableau 11 : Caractéristiques des souches de <i>P. aeruginosa</i> testées <i>in vitro</i>	77
Tableau 12 : Caractéristiques du SST3 des souches mutantes de CHA	80
Tableau 13 : Antibiogramme de la souche PA1293	113
Tableau 14 : Ratios obtenus dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë avec la souche CHA	118
Tableau 15 : Ratios obtenus dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë avec la souche PAK	121

## Remerciements :

Je remercie le Professeur Benoit Guery, auditionné par Fréquence Caribou, pour m'avoir initialement permis de réaliser un Master 2, et m'avoir donné l'opportunité de poursuivre deux années supplémentaires dans le labo. J'espère pouvoir un jour apporter autant que ce qui m'a été donné durant ces trois années. Merci pour la confiance que tu m'as accordé. Merci pour les « google time » entièrement libres !

Je remercie ma directrice de thèse, le Professeur Karine Faure, d'avoir accepté de suivre tout ce chantier. J'en profite pour le repréciser, comme Serge Karamazov : « aucun lien ... » !!

Je remercie le Docteur Eric Kipnis, d'avoir codirigé cette thèse et de m'avoir aidé dans la rédaction de ce travail, pour sa disponibilité, sa rigueur et son perfectionnisme. D'un point de vue plus personnel je remercie aussi l'ami qui a été présent tout au long de ces deux années dans les bons moments (Burgermeister, Denver, SF, les soirées écritures) comme dans les plus difficiles... D'avoir toujours joué ce rôle déterminant avec la plus grande simplicité et la plus grande compréhension. Merci d'avoir fait comprendre qu'il fallait changer pas mal de choses à bien des égards, de m'avoir fait aimer cuisiner asiatique, bref, d'avoir radicalement transformé le quotidien. J'ajoute du coup Valérie pour ses cheesecakes qui tombent toujours à pic !

Que serait le labo sans Rodrigue ! Rodrigue merci pour ta présence, ton enthousiasme, ta bonne humeur, cet humour décapant pour lequel un jour on finira en taule. Merci pour ton expertise, tes idées (bah oui, les peptides antimicrobiens c'était lui !).

Je remercie le Dr Mathias Chamaillard sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour et qui m'a ouvert les portes d'une recherche que je pensais alors inaccessible.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Doyen Didier Gosset, qui m'a permis de débiter mes années de recherche lors de mon année de Master 2.

Un remerciement tout particulier va à Jean-Baptiste Mear dit « le gentil », mon talentueux initiateur à la recherche, celui qui m'a beaucoup appris et surtout à cet ami cher qui j'espère, reviendra vite dans nos contrées ; JB avec qui nous avons tout partagé, les catas comme les réussites, les frites les bières et plus encore. Ces remerciements particuliers seraient incomplets si tu n'apparaissais pas, Guillaume Schurtz, avec qui nous avons partagé notre année de Master 2 et qui nous a lâchement abandonné pour la thèse ! Cette année 2010-2011 restera dans nos mémoires, accompagnée du fricadellome, de Fry, de Zap, de Barney et de la Henrica Duff grande réserve.

A ceux du nouveau groupe de recherche hôte pathogène, un groupe à la pointe du progrès, Marion, Laura, Marie et Aude, ceux qui étaient présents et ont égayé ma seconde année, à mes camarades de la terrasse du 6<sup>e</sup> étage et du déjeuner thaï du vendredi midi.

A nos amis Belges, Julien et Ahalieyah, ce ne sont pas des remerciements à de simples collègues, mais des pensées pour mes amis. Julien nous retournerons au Rocky Mountain. Ahalieyah merci pour toutes nos discussions sur skype et nos débats sur le T3SS En réalité, quelle chance d'avoir pu faire cette thèse.

A ceux de l'U1019 qui m'ont beaucoup appris, qui ont toujours été présents pour m'aider et sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour: le Dr Philippe Gosset, Sylvain, Teddy, Anne, Myriam, Gaëlle, et Muriel.

A Thierry Chassat, un homme comme on en rencontre peu, sans qui ce travail n'aurait jamais pu avancer et qui m'a tant appris. Merci pour ton aide si précieuse.

A ceux de l'excellent laboratoire d'immunologie : un ami cher et un mentor, le Dr Sylvain Dubucquoi, un homme d'exception dont la bonne humeur peut me faire regretter de ne pas être immunologiste. A Jacques, l'homme du cytomètre du CHRU de Lille toujours présent et toujours dispo, Carine, Vincent et tous ceux qui nous ont donné un coup de main ou quelques tubes à hémolyse pour dépanner ;)

A ceux de l'unité TheREx, Le professeur Bertrand Toussaint, Audrey et Hichem qui m'ont permis de créer moi-même mon armée de mutants.

Mes remerciements vont aussi à ceux qui m'entourent au quotidien. Notre gang de néphrologues, Amel, Marie-Flore, Zac et Camille, merci d'avoir été là, d'avoir cru que ça pourrait marcher. A Thierry et Patrice, dont les jus de fruits permettent d'écrire 10 pages en une heure et qui promettent de l'évasion dans le triplage.

A ma famille, qui m'a entouré tout au long de ces années, qui a supporté les bons comme les mauvais moments, ce travail vous est destiné, il est le fruit de tout ce que vous m'avez apporté. Cécile, t'embarques pas la dedans c'est un piège à loup ;)

A Josh, Jim et Eddie, la singha, le bœuf au basilic et les pancakes... Tu comprendras.

Je remercie les membres du jury, Madame le Professeur Françoise Van Bambeke et Mme le Docteur Sophie de Bentzmann, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse, d'avoir relu et apporté leur expertise sur ce travail.

Enfin je remercie la région Nord-Pas de Calais et le CHRU de Lille pour avoir accepté de financer ces deux années de thèse et m'avoir permis de réaliser ce travail.

# Partie 1 : Introduction

## Chapitre 1 : *Pseudomonas aeruginosa*

### 1) Caractéristiques

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, mobile, ubiquitaire de l'environnement. Aérobie, cette bactérie est cependant capable d'utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons en croissance anaérobie. *P. aeruginosa* est un saprophyte de l'environnement retrouvé dans l'eau, le sol, et les plantes sous forme planctonique ou dans un biofilm(1). Le génome de *P. aeruginosa* a été séquencé en 2000. Il s'agit d'un des plus grands génomes bactériens, composé de 6,3 Méga bases codant 5570 cadres de lecture. Cette bactérie possède un nombre important de gènes impliqués dans des systèmes de régulation de la virulence ou dans des fonctions métaboliques, expliquant ainsi son adaptation et sa résistance en milieu hostile(2). En effet, cette diversité génomique lui confère la capacité d'utiliser un grand nombre de composés organiques pour se développer et perdurer dans des niches écologiques variées et pauvres en nutriment(3). Chez l'Homme, *P. aeruginosa* est une bactérie commensale de la peau ainsi que du tractus gastro-intestinal(4,5).

### 2) En pathologie humaine

#### a. Généralités : un pathogène opportuniste

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste capable d'infecter des hôtes variés comme l'Homme, les plantes et les animaux(6). Elle est responsable d'infections chroniques et exacerbations aiguës chez les sujets présentant un déficit de l'immunité innée pulmonaire chronique (mucoviscidose, bronchectasies)(7) et d'infections aiguës respiratoires dans les unités de réanimation et de soins intensifs chez ces patients ayant également une immunité innée pulmonaire altérée(8). Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) à *P. aeruginosa* représentent la première cause de pneumonies en réanimation et sont associées à une morbi-mortalité importante(8,9). En plus de résistances naturelles étendues, les isolats cliniques actuels montrent de manière croissante des résistances acquises aux antibiotiques de dernière génération(10,11). Enfin, *P. aeruginosa* est impliquée dans les surinfections cutanées

chez le grand brûlé(12), les infections de la sphère otologique et urinaire chez le diabétique(12), les infections osseuses, les infections oculaires(13) et neuro-méningées.

*b. Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique.*

En 2004, le système de surveillance national des infections nosocomiales des Etats-Unis. (NNIS) publiait que *P. aeruginosa* était le premier agent infectieux responsable de PAVM nosocomiales, touchant à la fois les patients de réanimation médicale, mais aussi de réanimation chirurgicale et tout particulièrement dans les suites de chirurgie cardio-thoraciques et traumatolo-orthopédiques(14).

Inoffensive chez l'individu sain, elle devient un pathogène opportuniste pour l'homme en cas d'altération des défenses immunitaires innées(15). En réanimation, la présence d'une sonde d'intubation trachéale, l'altération de la clairance muco-ciliaire ou une éventuelle neutropénie (16,17) sont autant de facteurs de risque d'infection respiratoire aiguë à *P. aeruginosa*(9). L'infection respiratoire fait le plus souvent suite à une colonisation des voies aériennes par la bactérie(5,18). La source de contamination peut être exogène, mais aussi endogène via un portage oropharyngé ou gastro-intestinal préexistant, favorisé par un traitement antibiotique préalable ou une hospitalisation prolongée. Une fois colonisant, les nombreux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* contribuent à sa pathogénicité(5,18,19).

### **3) Les principaux facteurs de virulence**

*a. les systèmes de sécrétion (SST) (hors SST3)*

Outre la compétition permanente avec les autres micro-organismes pour l'accès à une niche écologique et ses nutriments, *P. aeruginosa* doit aussi lutter contre les défenses de l'hôte pour accéder aux ressources et éviter son éradication par le système immunitaire(15).

Dans cette optique de survie et prolifération bactérienne, *P. aeruginosa* peut tenter de manipuler la réponse de l'hôte à ses propres fins(20). En effet, *P. aeruginosa* est capable de produire de nombreuses protéines qui seront liées à la membrane bactérienne(21,22), sécrétées dans le milieu extérieur voire directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes(18,23). Ces mécanismes sont appelés phénomènes de sécrétion(24). Chez les bactéries (25,26) à Gram négatif, la membrane bactérienne est composée de deux feuillettes

hydrophobes, membrane externe (ME) et membrane interne (MI) délimitant un espace inter-membranaire, appelé périplasma (PP) (Figure 1)(24). Au travers de cette membrane bactérienne, a été mise en évidence une immense diversité de mécanismes impliqués dans les phénomènes de sécrétion de protéines bactériennes actives (24,27). Il existe par ailleurs 7 types de systèmes de sécrétion dont le dernier (type VII) récemment décrit chez *Mycobacterium spp*(28), mais seulement cinq différents systèmes de sécrétion (SSTx) ont été décrits chez *P. aeruginosa* (Figure 1)(26).

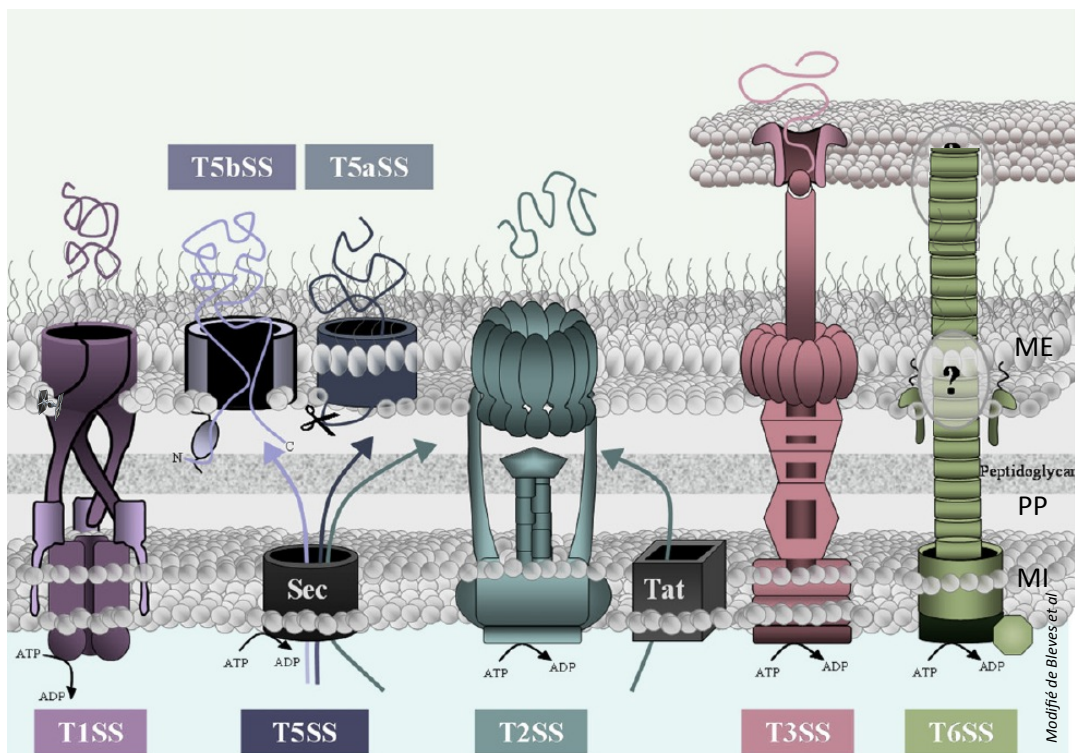


Figure 1 : Les systèmes de sécrétion de *P. aeruginosa*

Le système de sécrétion de type 1 (SST1) est le plus simple des systèmes de sécrétion décrits à ce jour. Il correspond à une protéine de la membrane externe insérée sur la membrane interne(26). Cette protéine appartient à la famille des protéines ABC (ATP-binding cassette) et permet la translocation de protéines telle que la protéase alcaline (AprA)(26). Ce transporteur nécessite une concentration de fer minimale pour son fonctionnement. Le SST1 et l'AprA jouent un rôle clé dans les phases initiales précoces de l'infection respiratoire aiguë(26).

La sécrétion par les SST2 et SST5 suit un processus en 3 étapes(26,29) avec une maturation dans le périplasma. En effet, les exoprotéines sécrétées par ces voies sont synthétisées sous forme de précurseurs et le peptide issu du clivage de leur partie N-terminale permet de les orienter vers les transporteurs Sec et Tat. Ces deux systèmes permettent le passage des exoprotéines du cytosol jusqu'au périplasma. Le système Sec permet le passage de protéines repliées tandis que le système Tat est impliqué dans le passage des protéines non repliées. Le passage du périplasma à travers la membrane externe vers le milieu extérieur est assuré par les SST2 et SST5 (29). Le SST2 est capable de sécréter environ 13 exoprotéines dont deux protéines cytotoxiques (LasA et LasB dans le milieu)(29). L'élastase est encodée par le gène *lasB* et dégrade l'élastine, un composant contribuant à l'élasticité de l'interstitium pulmonaire(30). Elle clive aussi la protéine D du surfactant (SP-D)(21), elle-même impliquée dans l'activation des phagocytes, et la régulation de la clairance bactérienne favorisant ainsi les lésions dans les infections respiratoires aiguës. Le rôle précis du SST2 dans la virulence bactérienne semble retardé à partir de la 48<sup>e</sup> heure dans des modèles *in vivo* d'agression respiratoire aiguë(29). Le T5SS possède quant à lui plusieurs structures, des auto-transporteurs (T5SS-a et c) (31)ainsi qu'un système de sécrétion à 2 partenaires (T5SS-b)(31). Son rôle précis dans les infections respiratoires aiguës n'est pas encore déterminé. Le système de sécrétion de type 6 (SST6) est le dernier système découvert chez *P. aeruginosa* (32). Il est largement répandu parmi les bactéries à Gram négatif et a été pour la première fois décrit chez *Vibrio cholerae* (32). Récemment, il a été décrit que le SST6 de *P. aeruginosa* permettait de sécréter deux protéines effectrices, Tse1 et Tse3, dans le périplasma d'autres micro-organismes(23). Ces deux effecteurs hydrolysent le peptidoglycane permettant la lyse des autres microorganismes et conférant à *P. aeruginosa* un avantage important dans la lutte pour les niches écologiques et les nutriments(23).

#### *b. Le système de type 3 (SST3)*

Pour établir une infection, *P. aeruginosa* utilise un arsenal de facteurs de virulence. Parmi ceux-ci, le SST3 est un des mieux caractérisés dont la structure s'apparente à une « aiguille » ayant une base transmembranaire surmontée d'un filament extra-membranaire. Trente six gènes du génome de *P. aeruginosa*, répartis en 5 opérons, sont impliqués dans la synthèse et la régulation du SST3(18,33). Six autres gènes, situés en dehors de ce complexe vont coder pour les protéines chaperonnes des protéines effectrices du SST3(34). Ce complexe peut être séparé en 5 grandes parties (Figure 2A et 2B) : les gènes codant pour les protéines de l'aiguille permettant le transport des protéines du cytosol vers l'environnement (Figure 2B,

jaune) (18,35), les gènes codant pour les protéines du translocon permettant la perméation de la membrane cellulaire eucaryote et la sécrétion des protéines effectrices dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (Figure 2B, bleu) (18), les gènes codant pour les protéines chaperonnes des protéines effectrices (Figure 2B, marron), les gènes codant pour les protéines effectrices, exotoxine S, exotoxine T(36), exotoxine Y(37) et exotoxine U(38) (Figure 2B, rouge), et enfin les gènes codant pour la régulation du SST3 (Figure 2B, vert).

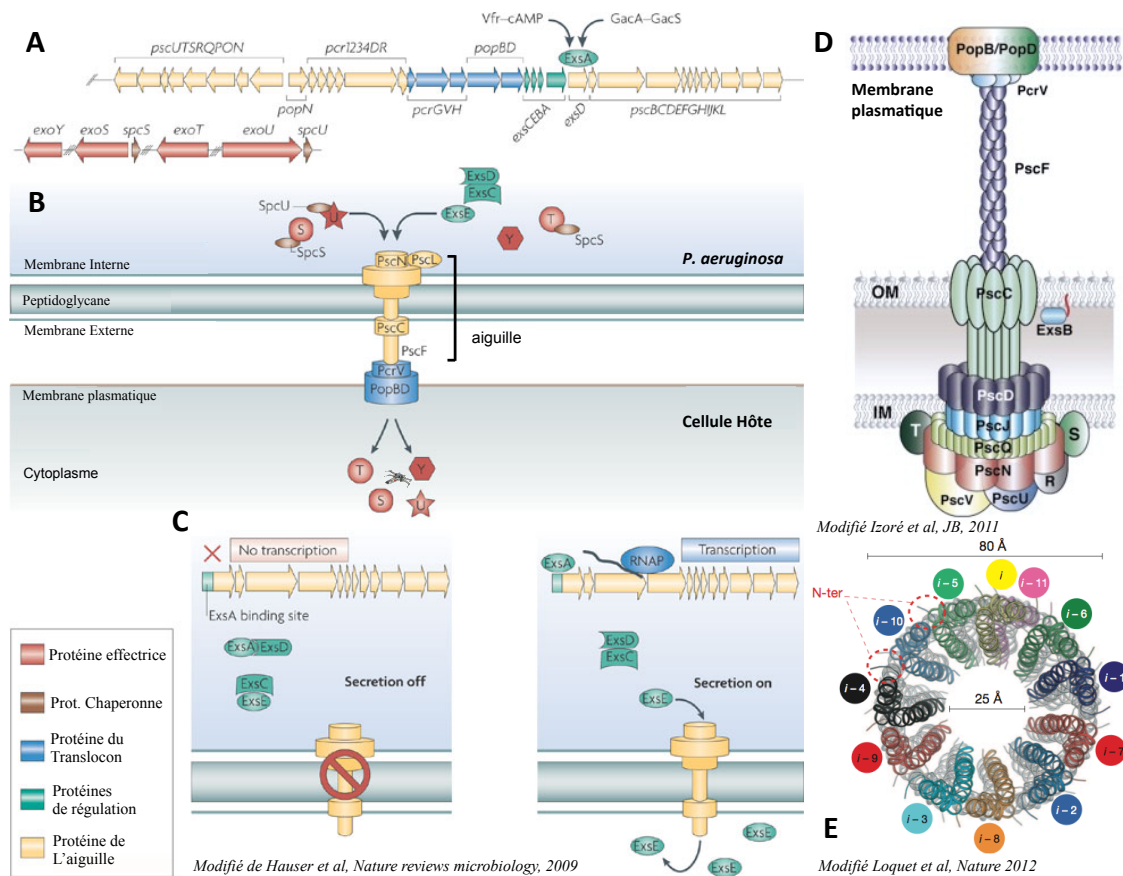


Figure 2 : Le système de sécrétion de type III (SST3)

## Régulation du SST3

Le SST3 est régulé à deux niveaux. D'une part au niveau de la transcription des gènes du SST3 et d'autre part au niveau de la sécrétion des protéines effectrices. En effet, la transcription du gène du SST3 est dépendante du démarrage d'un processus de sécrétion de protéines effectrices induit par le contact avec une cellule hôte. Une fois ce contact réalisé, la



transcription commence, permettant ainsi une production importante de protéines au moment où le SST3 peut exercer une activité sur la cellule eucaryote. La transcription des gènes est sous la dépendance de ExsA(39), un membre des régulateurs transcriptionnels de la famille AraC/XylS. ExsA est lié aux promoteurs des gènes codant pour les protéines du SST3(18,39). De plus, un mécanisme élaboré d'interactions entre ExsA et trois autres protéines de régulation, ExsC, ExsD(40) et ExsE(41) permet de réguler finement l'activation de la transcription par ExsA au moment de la sécrétion des protéines effectrices (Figure 2A). Dans des conditions où il n'y a pas de sécrétion de protéines effectrices par le SST3, ExsA est lié à ExsD bloquant la transcription des protéines du SST3(40). ExsC, en se liant à ExsD et en le bloquant, clive le complexe ExsA-ExsD, libérant ExsA et permettant le début de la transcription des protéines du SST3. Ce phénomène est lui-même inhibé dans les conditions où il n'y a pas de sécrétion de protéines par ExsE, qui se lie lui-même avec ExsC avec une plus grande activité, empêchant ainsi le clivage du complexe ExsA-ExsD par ExsC et l'activation de la transcription(18). Ainsi, lorsqu'il existe un contact de la bactérie avec la cellule hôte, la protéine ExsE est sécrétée par l'aiguille et le translocon dans le cytoplasme de la cellule eucaryote(41), libérant ainsi ExsC, clivant le complexe ExsA-ExsD, libérant ainsi ExsA et conduisant à l'activation de la transcription des protéines du SST3 (Figure 2C). Enfin, plusieurs équipes rapportent une régulation ExsA-indépendante, liée à des stimuli de l'environnement ou dans des conditions particulières.

### **Protéines de l'aiguille et du translocon**

L'aiguille est un complexe multi-protéique responsable du transport spécifique des protéines effectrices du système du SST3 du cytosol vers l'environnement extracellulaire à travers la membrane interne, le périplasme et la membrane externe(18,35). L'aiguille est composée de deux parties : une base transmembranaire (correspondant à des protéines réparties sous forme d'un anneau) et le filament extra-membranaire (donnant la forme caractéristique d'aiguille) (Figure 2D) (35,42). Cette structure est extrêmement bien conservée parmi les différentes bactéries à Gram négatif : on retrouve un assemblage similaire chez *Yersinia spp*, *Salmonella enterica*, et *Shigella flexneri*(42). Le filament est composé d'un assemblage de protéines PscF (Figure 2D) (35,43), formant une structure tubulaire par lequel sont sécrétées les protéines effectrices. Cette structure est longue de 60 à 120 nm et large de 6 à 10 nm (Figure 2E) (42). Les protéines de la base ont été relativement peu étudiées. La protéine PscN (Figure 2D) semble être une ATPase qui fournit l'énergie nécessaire à la translocation des protéines effectrices et est régulée par PscL (Figure 2D)(26). PscC (Figure 2D) semble former un

oligomère avec PscW, une lipoprotéine, permettant la création du canal sécréteur à travers la membrane externe(18). Enfin par analogie à *Yersinia spp*, PscP semble impliqué dans le contrôle de la longueur du filament par un mécanisme non élucidé(43).

Les protéines du translocon sont sécrétées par l'aiguille et vont constituer le pore dans la membrane de la cellule eucaryote, permettant la translocation des exotoxines directement dans le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 2B, 2C, 2D)(18). Ce système est extrêmement efficace et imperméable car seul 0,1% des protéines sécrétées vont s'échapper dans l'environnement extracellulaire. A l'instar de *Yersinia*, *salmonella* et *Shigella spp*, le translocon de *P. aeruginosa* est constitué de 3 protéines : PopB, PopD et PcrV(43). PopB et PopD vont se lier l'un à l'autre et interagir avec la membrane cellulaire de l'hôte pour former le pore de translocation large de 2,8 à 6,0 nm(44). PcrV est la protéine de soutien de l'oligomère formé par PopB et popD (Figure 2D) et est sécrété par l'aiguille(45). Bien que la présence de PcrV soit nécessaire pour la formation du pore par PopB et popD, PcrV ne participe pas à la formation du pore membranaire en lui-même(46). Ainsi PcrV est une protéine permettant le lien entre l'aiguille et le translocon et permet de conduire les protéines effectrices vers le cytoplasme de la cellule eucaryote (Figure 2D)(18).

### **Les exotoxines du SST3 et leurs protéines chaperonnes.**

Au total, quatre protéines effectrices du SST3 ont été identifiées, ExoS, ExoT, ExoY et ExoU(36,37,47). Ainsi, le SST3 de *P. aeruginosa* possède le moins de protéines effectrices parmi l'ensemble des SST3 caractérisés du genre bactérien(43). Ceci est particulièrement surprenant étant donné le large spectre d'hôtes et d'environnements bactériens dans lesquels *P. aeruginosa* est retrouvé, mais ce faible nombre d'exotoxines doit être mis en balance avec le nombre de systèmes de sécrétions différents arborés par *P. aeruginosa* et par le large spectre d'eucaryotes touchés par l'activité de ces exotoxines. Enfin, toutes les protéines du SST3 sont liées dans le cytosol bactérien à une protéine chaperonne qui facilite leur stockage et leur délivrance à l'aiguille. Ainsi ExoS et ExoT partagent la même chaperonne SpcS (ou Orf1 Figure 2A, 2B)(48). De même, ExoU est liée à la protéine SpcU(25). Par contre, aucune protéine chaperonne pour ExoY n'a été retrouvée à ce jour. Parmi les protéines sécrétées par l'aiguille, on retrouve une protéine chaperonne associée à PopB et PopD, appelée PcrH(42). PscG et PscE(42) sont les deux chaperonnes de Pscf, la protéine formant le filament de l'aiguille. Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, ExsC est protéine chaperonne de ExsE(41).

Bien que les exotoxines soient fortement impliquées dans les infections respiratoires aiguës, les gènes codant pour chacune de ces exotoxines ne sont pas toujours retrouvés dans les isolats cliniques issus de PAVM, même en présence des autres gènes codant pour le SST3. Ainsi, 58 à 72% des isolats possèdent les gènes codant pour ExoS, 89 % pour ExoY, 92 à 100% pour ExoT, et seulement 28 à 42% pour ExoU(8). Pour des raisons inconnues, la présence des gènes *exoS* et *exoU* est mutuellement exclusive, les souches possédant l'un ou l'autre mais jamais les deux(8,49).

ExoS est composée de 2 parties dont les activités sont bien distinctes. Une première partie possède une GTPase-activating protéine (GAP) et l'autre une activité de type une adenosine diphosphate ribosyl transférase (ADPRT)(36). L'activité GAP d'ExoS va cibler des GTPases contribuant au maintien du cytosquelette d'actine de la cellule hôte (rac, rho, cdc42). La dégradation du cytosquelette d'actine par l'activité GAP d'ExoS est associée une diminution de l'internalisation de *P. aeruginosa*, suggérant ainsi un rôle dans la prévention de la phagocytose. L'activité ADPRT d'ExoS va elle aussi désorganiser le cytosquelette de la cellule hôte, mais permettra également de diminuer la synthèse d'ADN(25), le trafic vésiculaire intracellulaire et l'endocytose. La désorganisation du cytosquelette induite contribuera à la perte de l'adhérence intercellulaire et facilitera la pénétration de *P. aeruginosa* à travers les barrières épithéliales.

ExoT possède des domaines similaires à ExoS (36) et partage 76% des acides aminés avec cette dernière. Ainsi l'activité d'ExoT, à l'instar d'ExoS, passe par une activité GAP et ADPRT. Les études *in vitro* et *in vivo* confirment qu'ExoT cible les mêmes substrats qu'ExoS mais avec une activité réduite(36).

ExoY est une adénylate-cyclase sécrétée par le SST3. Elle possède deux domaines similaires à ceux de *Bordetella pertussis* (CyaA) ou *Bacillus anthracis* (EF)(37). Elle permet de lier l'ATP (Figure 3). En effet l'injection intra-cytoplasmique d'ExoY élève la concentration intracellulaire d'AMPc. Cette élévation conduit à une désorganisation du cytosquelette de la cellule hôte(50).

ExoU est une puissante phospholipase comprenant un domaine de liaison à la protéine chaperonne, et un domaine patatin-like encodant pour une phospholipase A2(47). Ainsi l'activité phospholipase A2 d'ExoU s'exerce sur un large éventail de substrats incluant des phospholipides et des lysophospholipides. En conséquence l'activation de d'ExoU conduit à

une mort cellulaire rapide et extrêmement inflammatoire apparentée à de la nécrose(49). La cytotoxicité de d'ExoU s'exerce à la fois sur les cellules phagocytaires professionnelles comme sur les cellules épithéliales ou endothéliales, favorisant la dissémination bactérienne. Enfin, une étude récente, in vivo, a montré que l'activité de d'ExoU s'exerçait dans le stade très précoce des infections respiratoires aiguës conduisant à une augmentation de la lésion pulmonaire rapide(38).

La présence de certaines exotoxines induira un type de lésion particulier, ainsi la sécrétion d'ExoS conduira à une mort cellulaire retardée avec des stigmates d'apoptose cellulaire tandis qu'ExoU conduira à une mort cellulaire rapide et très inflammatoire.

### Implications du SST3 dans les infections respiratoires aiguës.

Le SST3 est un facteur de virulence majeur dans les infections respiratoires aiguës à *P. aeruginosa*. En effet, Hauser *et al* ont démontré que l'expression du SST3, retrouvé dans 77% des isolats cliniques de PAVM(51), indépendamment de l'expression des exotoxines était corrélée à un pronostic défavorable pour le patient(8). Ciblant le SST3, le développement d'un anticorps monoclonal anti-PcrV(52) (Figure 4) inhibant la fonctionnalité du SST3(46) a permis de réduire la lésion pulmonaire et d'augmenter la survie dans un modèle murin d'infection pulmonaire(53,54). Cet anticorps a été récemment humanisé et testé au cours d'un essai clinique de phase 2 Dans cet essai, François *et al* ont montré que l'inhibition du SST3 permettait de réduire l'incidence des PAVM à *P. aeruginosa* chez les patients préalablement colonisés au niveau pulmonaire(55).

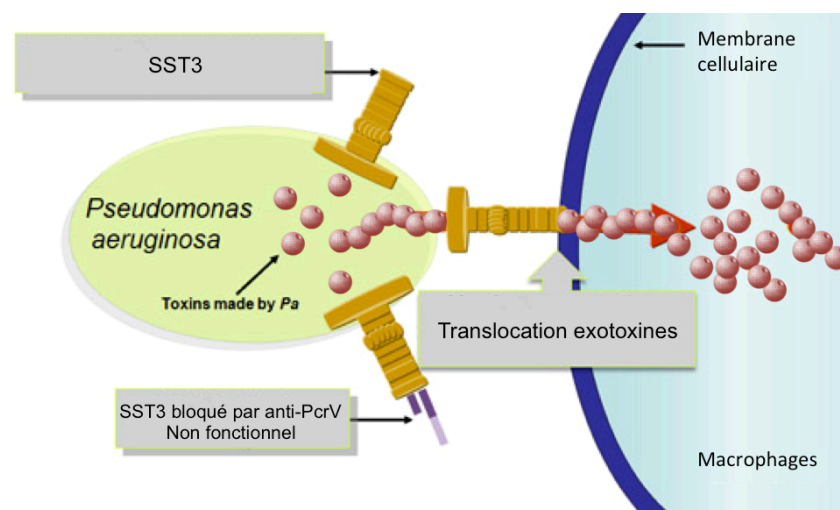


Figure 3 : KB001A : un anticorps anti-PcrV

c. Le flagelle.

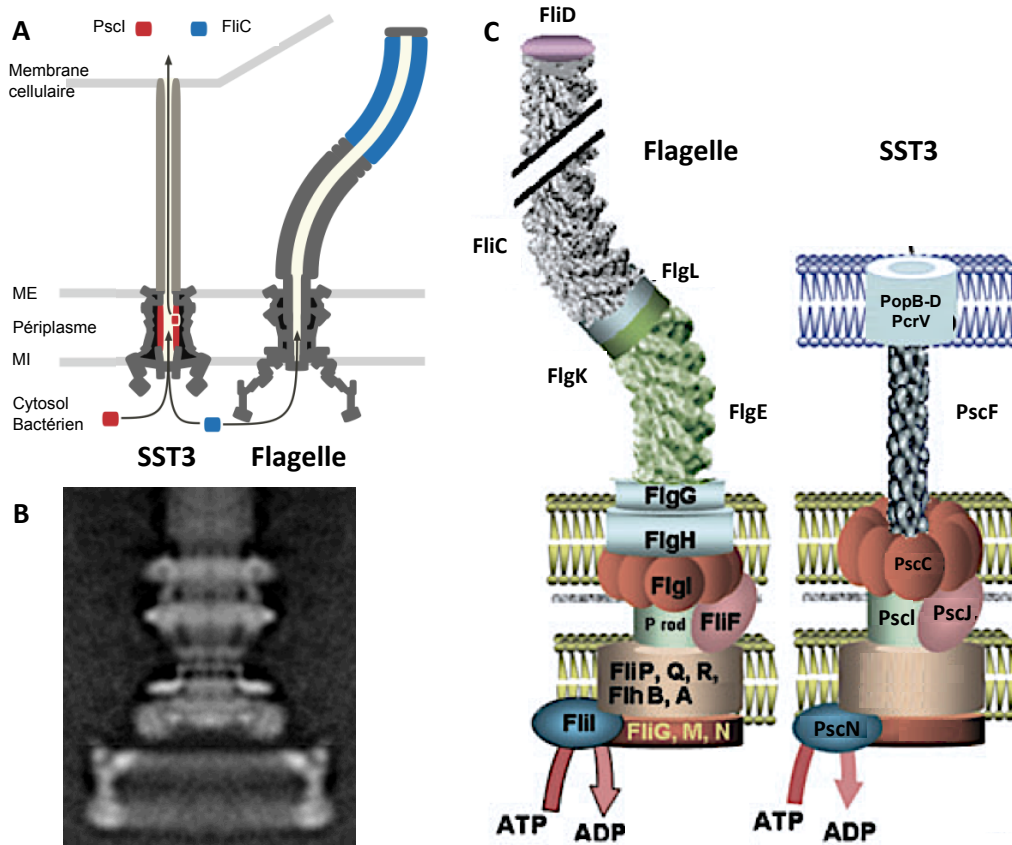
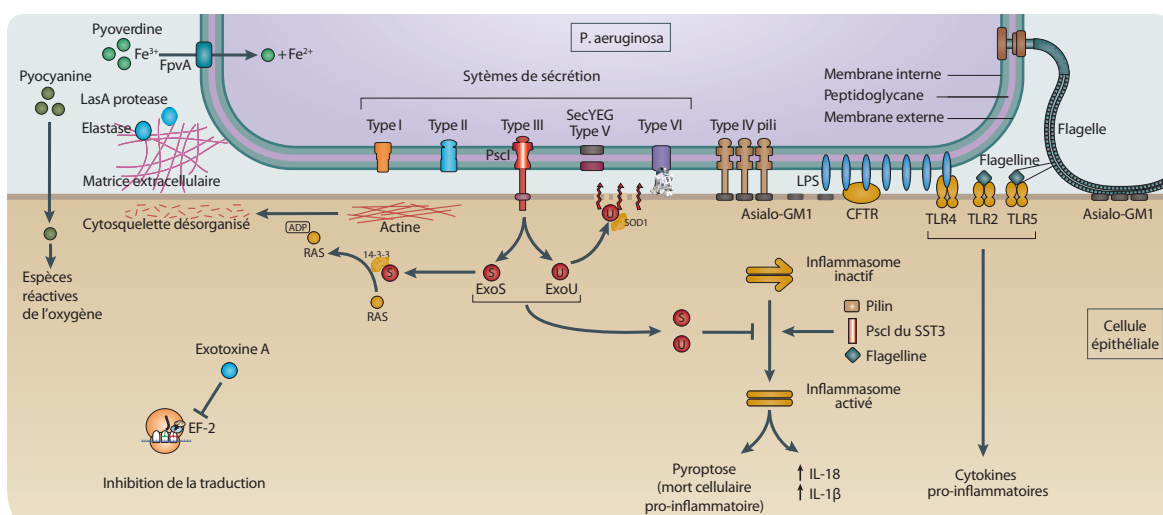


Figure 4 : Le flagelle de *P. aeruginosa* et son analogie au SST3

Le flagelle de *P. aeruginosa* se construit de la même façon qu'un système de sécrétion et plus particulièrement comme le SST3. Cette construction peut être comparée à celle d'une grue, de la base vers le sommet. En effet, l'expression des gènes du flagelle est régulée par 3 classes de promoteurs transcriptionnels. Les promoteurs de classe 1 activent des promoteurs de classe 2 conduisant à la transcription des protéines du corps basal et du crochet (Figure 4C). Cet appareil de sécrétion primaire une fois mis en place, permet la sécrétion d'un inhibiteur transcriptionnel appelé FlgM. Une fois le cytosol bactérien déplété en FlgM(56), des régulateurs transcriptionnels de classe 3 vont activer la transcription des derniers gènes codant pour le crochet et des protéines composant le filament : FliC et FliD(57). Le flagelle est donc constitué de trois parties. Tout d'abord le filament. C'est la partie la plus longue et la plus distale. Il s'agit d'un cylindre creux et rigide constitué d'un multimère de la protéine FliC

(Figure 5C) (58). Le filament est attaché au crochet. Ce crochet est d'un diamètre supérieur au filament et fait la jonction avec le corps basal (Figure 4C). Il est composé de plusieurs protéines FlgL, FlgK, FlgE et fait la liaison entre le corps basal et le filament flagellaire(56,59). Son rôle est de transmettre le mouvement du corps basal au filament. Le corps basal, à l'instar de celui du SST3 est constitué d'un assemblage de 4 anneaux enchâssés dans la membrane externe et la membrane interne (Figure 4C). Il est différent chez les Gram négatif et positif. Chez les bactéries à Gram négatif, comme *P. aeruginosa*, on retrouve deux anneaux extérieurs attachés à la membrane externe et au peptidoglycane (Figure 4B). Enfin deux autres anneaux mobiles servant de moteur flagellaire transmettent le mouvement au filament. Le flagelle assure la mobilité de la bactérie dans les milieux liquides (swimming) et semi-liquides (swarming)(2) et participe à l'adhésion bactérienne. La présence de ce flagelle unique et polaire dépend des souches de *P. aeruginosa* et de leur phénotype (56). En effet, les souches mucoïdes, isolées dans les infections chroniques et produisant un biofilm vont réprimer le flagelle(22). A l'inverse les souches isolées dans les PAVM sont majoritairement flagellées(60). Le flagelle fonctionnel confère un avantage à *P. aeruginosa*, comme en témoigne l'augmentation de la clairance bactérienne d'une souche ne pouvant exprimer la protéine FliC ( $\Delta$ FliC)(58) et ayant de ce fait un flagelle tronqué, par rapport à la souche non mutée(61,62).

*d. Autres facteurs de virulence impliqués dans les infections respiratoires aiguës*



**Figure 5 : Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa***

Outre les systèmes de sécrétion, *P. aeruginosa* possède de nombreux facteurs de virulence ; ils sont impliqués dans les infections pulmonaires aiguës et participent à sa reconnaissance par l'intermédiaire des récepteurs de l'immunité innée (pattern recognition receptors ou PRRs)(15).

### **i. Les pili**

*P. aeruginosa* possède des pili, appendices se situant à la surface de la paroi de nombreuses bactéries à Gram négatif (et exceptionnellement des bactéries à Gram positif) (63,64). D'apparence plus courtes et plus fines que le flagelle, et hérissant la surface, ils sont également impliqués dans la mobilité et l'adhésion bactérienne. Les pili sont des appendices filamenteux, de plusieurs micromètres de long, disposés régulièrement à la surface de la paroi. Le pilus individuel est constitué d'un polymère d'une protéine appelée piline, dont la constitution est différente selon les espèces bactériennes. *P. aeruginosa* possède une piline de type IV(63,64). Elle est elle-même constituée d'une hélice à 5 sous unités. La fimbriae de *P. aeruginosa* est quant à elle constituée de pili de type 1.

### **ii. Pyocyanine et Pyoverdine**

Parmi les autres facteurs impliqués dans la pathogénèse des infections respiratoires aiguës on notera la pyocyanine(65), un composé dérivé de la phénazine(66), induisant une diminution de la clairance mucociliaire, contribuant à diminuer l'intégrité de l'épithélium des voies aériennes. Enfin la pyoverdine(67), composé sidérophore produit par *P. aeruginosa*, est un régulateur permettant la sécrétion d'exotoxine A et de l'exoprotéine PrpL(68).

## **4) La souche CHA.**

La souche CHA est une souche clinique mucoïde de *P. aeruginosa*, isolée chez un patient atteint de la mucoviscidose par l'équipe du professeur Bertrand Toussaint à Grenoble en 1993 (Université Joseph Fourier, Laboratoire TheREx)(69). Cette souche a été séquencée, mais les données n'ont, à ce jour, pas été publiées. Elle partage une grande analogie avec le génome de PAO1. Outre sa capacité à produire des alginates, cette souche possède un unique flagelle polaire, un SST3 permettant la sécrétion d'ExoS, ExoT et ExoY(70).

## **Chapitre 2 : Généralités sur l'immunité innée pulmonaire.**

### **1) La réponse alvéolaire chez la souris : Généralités**

Les réponses immunes innées aboutissent à un recrutement alvéolaire de cellules immunes accessible par lavage bronchoalvéolaire. Ainsi la formule cellulaire d'un poumon de souris normal, non infecté, contient 90% de macrophages alvéolaires, 5% de polynucléaires neutrophiles et 5% de lymphocytes, avec une cellularité de l'ordre de  $10^5$  cellules/mL(71). Dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë induite par une bactérie comme *P. aeruginosa*, l'activation immédiate de l'immunité innée va conduire à une expansion cellulaire grâce au recrutement de polynucléaires neutrophiles se traduisant par une cellularité de l'ordre de  $10^7$  cellules/mL. La formule cellulaire sera donc ici composée de 85 à 90% de neutrophiles, 3 à 5% de macrophages et 5 à 10% de lymphocytes(71).

### **2) réponse innée, réponse adaptative**

La membrane alvéolaire pulmonaire est la plus grande surface du corps humain (avec la peau, le tube digestif et l'endothélium) perpétuellement en contact avec l'environnement extérieur, et de ce fait, continuellement exposée à une grande variété de micro-organismes(72). Pour s'adapter à l'environnement et maintenir l'homéostasie du corps humain, le système immunitaire fait appel à deux types de réponses : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative(15,72,73). La réponse innée est plus ancienne dans l'évolution et permet la reconnaissance immédiate d'un grand nombre de signaux de dangers : les motifs moléculaires associés au danger (DAMPs) et les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs)(74). Dans l'alvéole, l'activation de l'immunité innée par un microorganisme entraîne l'activation des macrophages alvéolaires résidents et le recrutement de cellules phagocytaires professionnelles comme les polynucléaires neutrophiles migrant depuis le compartiment sanguin vers le foyer infectieux(75). Cette immunité immédiate reconnaît un large spectre de motifs hautement conservés et partagés entre les différents micro-organismes(72,73).

Chez les espèces supérieures, une réponse immune adaptative est arrivée avec l'évolution. Cette réponse est, contrairement à la réponse innée, plus tardive, conduisant à la production d'anticorps spécifiques et de haute affinité pour l'antigène, reconnu par des cellules



présentatrices d'antigène professionnelles comme les cellules dendritiques ou les macrophages(76). Ces cellules vont, en plus de leur capacité à présenter l'antigène, produire de nombreuses cytokines inflammatoires pour recruter les lymphocytes de l'immunité adaptative : TCD4+, TCD8+, et B. Les anticorps vont ainsi être produits et vont opsoniser les micro-organismes et faciliter leur destruction par les cellules phagocytaires professionnelles (neutrophiles et macrophages)(76). En plus de cette spécificité, le système adaptatif est capable de garder en mémoire les antigènes déjà connus et répond ainsi plus rapidement et plus efficacement lors d'un nouveau contact avec le même antigène(77).

### **3) Organisation de l'immunité innée des voies respiratoires**

L'immunité innée pulmonaire est orchestrée par de nombreuses cellules (72). De ce fait, la morphologie et la composition cellulaire du tractus respiratoire varient en fonction de sa localisation de la trachée à l'alvéole. Trois principaux types cellulaires bordent les voies respiratoires, les cellules ciliées, les cellules caliciformes à mucus et les cellules de Clara. A l'instar du tractus gastro-intestinal, les voies respiratoires possèdent une flore de micro-organismes résidents : un microbiome. La structure particulière et complexe de l'épithélium pulmonaire est un élément essentiel de l'immunité innée permettant ainsi qu'un micro-organisme inhalé soit directement excrété des poumons par le transport muco-ciliaire(78). L'absence congénitale d'un transport muco-ciliaire fonctionnel est à l'origine de pathologies suppuratives chroniques comme la mucoviscidose, (par mutation du gène CFTR codant pour un canal chloré permettant la constitution du mucus), ou le syndrome de kartagener(7). En plus de l'épithélium respiratoire, les macrophages alvéolaires représentent la principale cellule sentinelle des voies respiratoires. Ces cellules de l'immunité innée peuvent phagocyter rapidement un micro-organisme inhalé et interagissent avec les protéines du surfactant, sécrétées par les cellules épithéliales de type II(72). Ces protéines du surfactant, font partie de la famille des lectines de type C appartenant au groupe des pattern recognition receptors (PRRs)(21) les récepteurs aspécifiques de l'immunité innée permettant la reconnaissance des DAMPs et des PAMPs(79).

### **4) Le rôle des pattern recognition receptors (PRRs)**

Parmi les récepteurs de l'immunité innée (PRRs), les Toll-like receptors (TLRs) ont été les premiers à être découverts et la plupart d'entre eux sont présents au niveau de l'épithélium respiratoire(72). Le rôle essentiel des TLR dans la réponse anti-infectieuse pulmonaire a été

largement étudié. En effet, TLR2, reconnaissant le peptidoglycane, un constituant des membranes bactériennes, a montré un rôle déterminant dans les infections bactériennes extracellulaires comme *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ou encore *P. aeruginosa*(61). L'activation préalable de TLR5, par de la flagelline purifiée, permet de protéger contre une pneumonie à *S. pneumoniae*(60) et est aussi impliqué dans la réponse contre de nombreuses bactéries.

Plus récemment, d'autres récepteurs intracellulaires de l'immunité innée ont été découverts et permettent de détecter les bactéries *intracellulaires*. Ces récepteurs, appelés Nod-like récepteurs (NLR)(80), reconnaissent des motifs semblables aux TLRs : NOD2 reconnaît le peptidoglycane et contribue à la défense contre le *pneumocoque* et *Chlamydia pneumoniae*(81), NLRC4 reconnaît la flagelline et semble impliqué dans la reconnaissance intracellulaire de nombreux pathogènes(82,83).

### **Chapitre 3 : Les inflammasomes dans l'immunité innée**

#### **1) Généralités**

L'inflammasome est un complexe multi-protéique intracellulaire permettant la détection de nombreux motifs moléculaires associés aux pathogènes ou au danger (Pathogen-associated molecular pattern, PAMPs, Danger-associated molecular pattern, DAMPs)(84). L'inflammasome joue un rôle critique dans l'initiation de la réponse immune par activation de la caspase-1(85). La procaspase-1 (p45) est clivée sous sa forme active (p10) grâce à un nod-like récepteur (NLR). La caspase-1 activée peut ensuite permettre la maturation par clivage de la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 provenant de l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B en IL-1 $\beta$  et IL-18 matures et biologiquement actives(86). Enfin, la caspase-1 induit une mort cellulaire inflammatoire à membrane rompue, appelée pyroptose(87-89).

De nombreux inflammasomes ont été décrits ces dix dernières années, reliés chacun à un NLR activateur particulier(84). Les NLR sont des détecteurs (« sensors ») de l'immunité innée(80). Les différents NLR représentent ainsi un mécanisme adaptatif permettant la reconnaissance de motifs de danger variés et d'initier rapidement la réponse immune.

## 2) Les Nod-like récepteurs (NLR)

### a. Présentation générale et mécanisme d'activation

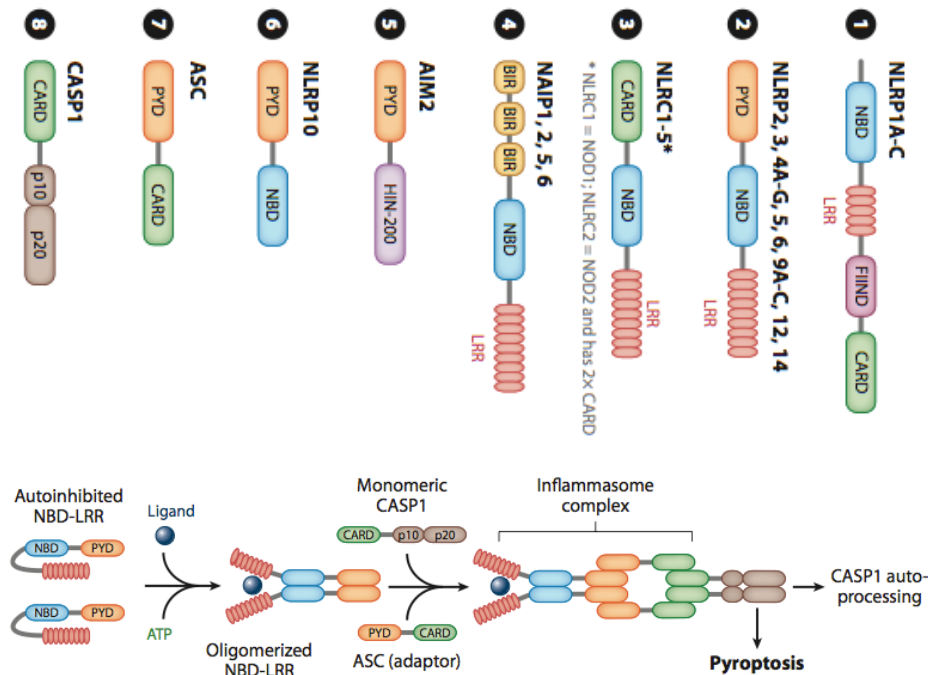


Figure 6 : Les Nod-Like Récepteurs et leur mécanisme d'activation

Les NLR ont été décrits et associés à un inflammasome il y a environ une dizaine d'années. Il est maintenant clair qu'il existe une multiplicité d'inflammasomes distincts, chacun activé par un ligand dont des signaux de dangers comme certains motifs moléculaires associés aux pathogènes(84). La formation d'un inflammasome se fait à la manière d'un échafaudage (Figure 6) dont le NLR est la principale protéine de soutien. En effet la plupart des NLR appartiennent à la famille des NBD-LRR et sont ainsi constitués d'un nucleotide-binding domain (NBD), d'un domaine de recrutement de caspase-1 (CARD), et sont appelés NLRCx ou d'un domaine PYD/PYRIN, (appelés alors NLRPx) et d'un domaine riche en leucine (LRR) à l'exception de NLRP10(90) et AIM2(91). Le LRR possède deux fonctions(80). La première permet de maintenir le NLR dans un état auto-inhibé, replié sur lui-même (Figure 6). En effet la mutation du LRR entraîne l'activation constitutive de l'inflammasome. La seconde fonction, par analogie aux LRR des Toll-like récepteurs (TLRs), permettrait aux NLR de reconnaître des PAMPs et des DAMPs variés mais cette fonction est remise en question car jusqu'à présent, aucune étude n'a montré d'interaction directe entre un NLR et son

ligand(84). En effet, le NBD semble plutôt permettre l'assemblage d'oligomères de plusieurs NLR, faisant la base de l'échafaudage, conduisant ensuite au recrutement de la caspase-1 via leur domaine CARD ou, pour les NLR ne possédant pas ce domaine, grâce à une protéine adaptatrice appelée ASC (Apoptosis-associated speck-like ou PYCARD)(92) interagissant avec le NLR via son domaine PYD et recrutant le NLR via son domaine CARD (Figure 6). Le complexe ainsi formé permet le recrutement d'un dimère de la caspase-1 qui va se cliver et s'activer par autoprotéolyse (Figure 6)(85). Tous les NLR n'activent pas un inflammasome, en effet NOD2 et NOD1 activent le facteur de transcription NFκB(93).

### *b. Différences entre Homme et souris*

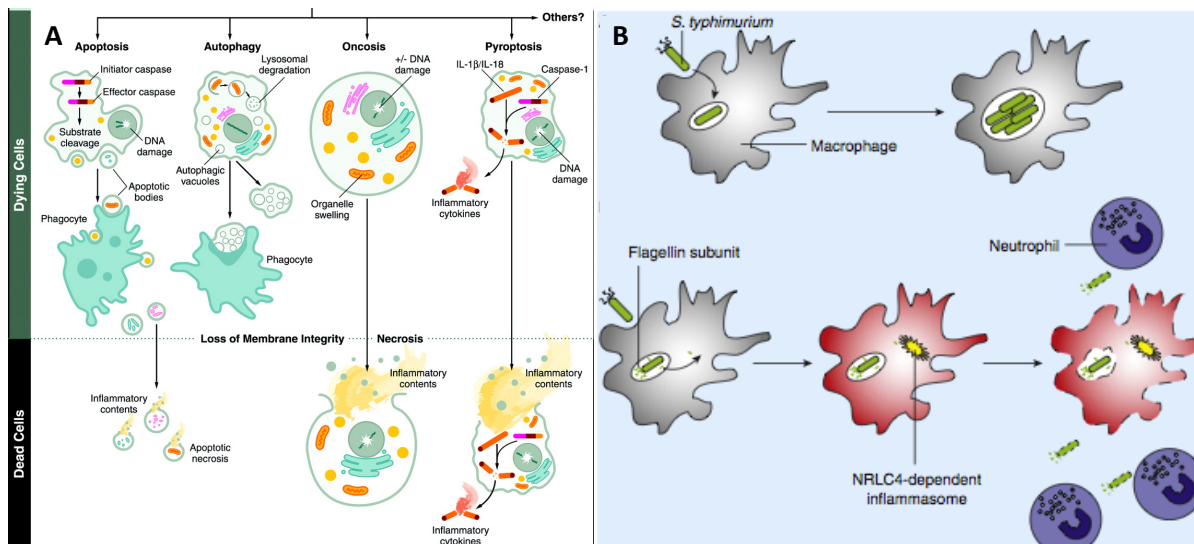
La recherche translationnelle doit prendre en compte les différences entre souris et humains. En effet, parmi les NLRPx communs avec la souris, les humains n'expriment que NLRP1 et NLRP4. NLRP1 peut par contre avoir un domaine CARD ou un domaine PYD chez l'humain. Chez l'homme, un seul NAIP est exprimé, un type de NLR particulier possédant un domaine de liaison au Baculovirus (BIR) (figure 6), contre 5 chez la souris. A l'inverse NLRP7, 8, 11 et 13 sont exprimés chez l'humain mais absents chez la souris(84).

### **3) La pyroptose**

La mort cellulaire induite par l'activation de la caspase-1 est nommée pyroptose(94). C'est une mort cellulaire pro-inflammatoire à membrane cellulaire rompue où le contenu du cytoplasme se déverse dans le milieu interstitiel (Figure 7)(88). Il n'existe pas à l'heure actuelle de marqueur spécifique de la pyroptose. De plus l'activation de la caspase-1 ne conduit pas toujours à la mort cellulaire pyroptotique(85). Le seul moyen d'étudier la survenue d'une mort cellulaire pyroptotique est la microscopie confocale par l'association et la localisation de deux marqueurs qui a été utilisée pour mettre en évidence la survenue de la pyroptose : d'une part l'activation de la caspase-1 (utilisation d'un peptide interagissant spécifiquement avec la caspase-1 activée couplé à un fluorochrome, le FAM-FLICA, et la présence de lysosomes excréteurs à la membrane cellulaire identifiés par un anticorps anti CD104b (LAMP-1) couplé à un fluorochrome(95).

Lorsqu'une bactérie à développement intracellulaire pénètre dans une cellule de l'hôte, le but de celle-ci est de se répliquer à bas bruit et d'éviter sa détection par le système immunitaire en se dissimulant dans le cytoplasme ou dans un compartiment cellulaire dans l'endosome(96). La présence de récepteurs intracellulaires de l'immunité innée comme les NLRs permet de

reconnaître la présence intracellulaire d'un motif bactérien et de développer une réponse immunitaire adaptée pour éliminer ce pathogène(80). Ainsi, lorsqu'une bactérie intracellulaire comme *Salmonella typhimurium* pénètre dans le cytoplasme de la cellule hôte, sa flagelline (protéine FliC) est reconnue par NLRC4(97,98). L'activation du NLRC4-inflammasome conduit alors à la mort cellulaire pyroptotique de la cellule infectée et permet d'exposer la bactérie camouflée aux défenses de l'hôte et particulièrement aux cellules phagocytaires professionnelles comme les polynucléaires neutrophiles, recrutées par l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 sécrétées grâce à l'activation de l'inflammasome (Figure 7). Dans un modèle murin d'infection à *S. typhimurium*, les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> présentaient une susceptibilité accrue à l'infection par ce pathogène avec une diminution de la survie et de la clairance bactérienne. Cependant, lorsque les souris *Wt* étaient infectées avec une souche mutée de *S. typhimurium* dont la production de protéines FliC était forcée pendant la phase intracellulaire de l'infection, la souche était beaucoup mieux détectée et contrôlée(87,99). Les souris présentaient une clairance bactérienne accrue et une survie meilleure comparées aux souris infectées avec la souche sauvage (Figure 7) (87). Les mêmes résultats ont été obtenus avec d'autres modèles infectieux utilisant des pathogènes à réplication intracellulaire comme *Legionella pneumophila*(100), *Listeria monocytogenes*(101), *Francisella tularensis*(102), *Yersinia spp*(103) ou *Burkholderia spp*(104).



**Figure 7 : La pyroptose : une mort cellulaire pro-inflammatoire exposant les pathogènes intracellulaires au système immunitaire.** A. les différentes morts cellulaires. B. Intérêt de la pyroptose dans les infections bactériennes intracellulaires

Ainsi les inflammasomes permettent de détecter les micro-organismes se camouflant à l'intérieur de la cellule et dont la présence aurait ainsi « échappé » aux autres récepteurs de l'immunité innée comme les TLR. Ce mécanisme d'échappement est ainsi pris en défaut par

la détection de PAMPs comme le flagelle par l'inflammasome et permet alors, grâce à la pyroptose, d'exposer le pathogène aux cellules phagocytaires recrutées par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire comme l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 matures(89).

#### 4) IL-1 $\beta$ et IL-18

##### a) Généralités

L'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 sont deux effecteurs essentiels dépendants de l'activation de l'inflammasome. Ils sont d'abord produits sous forme non active, pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18, dans le cytoplasme des cellules immunitaires sous la dépendance du facteur de transcription NF $\kappa$ B. Lorsque la caspase-1 est activée, les formes inactives sont clivées en IL-1 $\beta$  et IL-18 matures et sont sécrétées par la cellule(86).

Ces deux cytokines contribuent au recrutement des polynucléaires neutrophiles. Mais bien qu'elles soient sécrétées de façon concomitante, elles possèdent des rôles différents :

- L'IL-1 $\beta$  contribue précocement à l'organisation de la réponse immune adaptative par l'intermédiaire de la stimulation de l'IL-1R permettant secondairement la sécrétion d'IL-12 d'IL-8 et de nombreuses autres chimiokines(105,106).
- L'IL-18, de son côté, induit la production d'IFN $\gamma$ , contribuant ainsi au contrôle des infections intracellulaires(107,108).

##### b) IL-1 $\beta$ , IL-18 : deux cytokines produites par l'inflammasome, deux effets opposés

Ces deux cytokines peuvent donc jouer des rôles très différents lors d'une infection. Pour illustrer ces différences, le rôle de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 a été étudié par deux équipes lors d'une infection à *Burkholderia pseudomallei*(104), une bactérie se répliquant dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles. Dans ce modèle, le recrutement des neutrophiles par l'IL-1 $\beta$  est délétère pour l'hôte tandis que l'IL-18 joue un rôle protecteur central. Ainsi les souris *IL-1R*<sup>-/-</sup> ne pouvant recruter de polynucléaires neutrophiles montraient une survie significativement augmentée par rapport aux souris *Wt* et présentaient une diminution significative de la dissémination bactérienne(104). A l'inverse, l'IFN $\gamma$ , nécessaire au contrôle de l'infection à *B. pseudomallei*, était diminué chez les souris *IL-18*<sup>-/-</sup> qui ne pouvaient

contrôler l'infection. L'apport d'IFN $\gamma$  exogènes aux souris *IL-18*<sup>-/-</sup> permettait de rétablir une réponse adaptée(104),

### **5) Implications des NLR et de l'inflammasome en pathologie humaine**

Le premier NLR dont l'implication a été démontrée en pathologie humaine est NOD2(109). En effet une mutation du domaine LRR entraînant un défaut de reconnaissance du muramyl dipeptide, son ligand, est retrouvé dans environ 60% des patients atteints d'une maladie de Crohn, et par ailleurs, NOD2 est aussi impliqué dans le syndrome de Blau une pathologie granulomateuse cutanée chronique(16). Les inflammasomes peuvent reconnaître des PAMPs et participent à la réponse anti-infectieuse mais reconnaissent aussi certains DAMPs. Le NLRP3-inflammasome, permet la reconnaissance de l'acide urique et induit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  en réponse(110). L'IL-1 $\beta$  joue un rôle majeur dans la symptomatologie observée à la phase aiguë des crises articulaires de goutte(111). Le développement d'un antagoniste de l'IL-1R (anakinra, KINERET)(106) ou des anticorps monoclonaux humanisés anti-IL-1 $\beta$ (112) (canakinumab, ILARIS) ont révolutionné la prise en charge des formes sévères et permettent d'obtenir rapidement un effet anti-inflammatoire et antalgique. Le NLRP3-inflammasome reconnaît aussi certains motifs lipidiques comme certains acides gras tels que les céramides, le palmitate ou encore le mmLDL(113). Cette reconnaissance conduit à l'activation des macrophages infiltrant les adipocytes et le pancréas et entraîne une destruction des îlots  $\beta$  de Langerhans, contribuant ainsi à l'insulino-résistance et à la progression de la maladie athéromateuse. Le NLRP3-inflammasome semble devenir une cible dans le traitement du syndrome métabolique. NLRP3 est aussi appelé cryopyrin car il est impliqué dans la physiopathologie des cryopyrinopathies(114), dont la symptomatologie correspond à une fièvre, des rashes cutanés et des arthralgies déclenchés au froid. L'inhibition de l'IL-1 $\beta$  par une IL-1-binding protein comme le riloncept (ARCALYST) a transformé la qualité de vie et le pronostic de ces patients.

Bien que de découvertes récentes, la compréhension des NLR et des différents inflammasomes a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans des pathologies invalidantes. Les traitements inhibant l'activité de l'IL-1 $\beta$  ont ainsi radicalement changé le pronostic des patients.

## 6) Le NLRC4-inflammasome

### a. Structure de NLRC4

La structure de NLRC4 a été récemment élucidée et l'analyse cristallographique confirme l'activité auto-inhibitrice du domaine LRR(115,116). En effet la position du LRR (Figure 8, gris) à proximité du NBD (Figure 8, Rose) bloque le NBD qui ne peut interagir avec un autre NBD et séquestre ainsi la protéine sous forme monomérique(115).

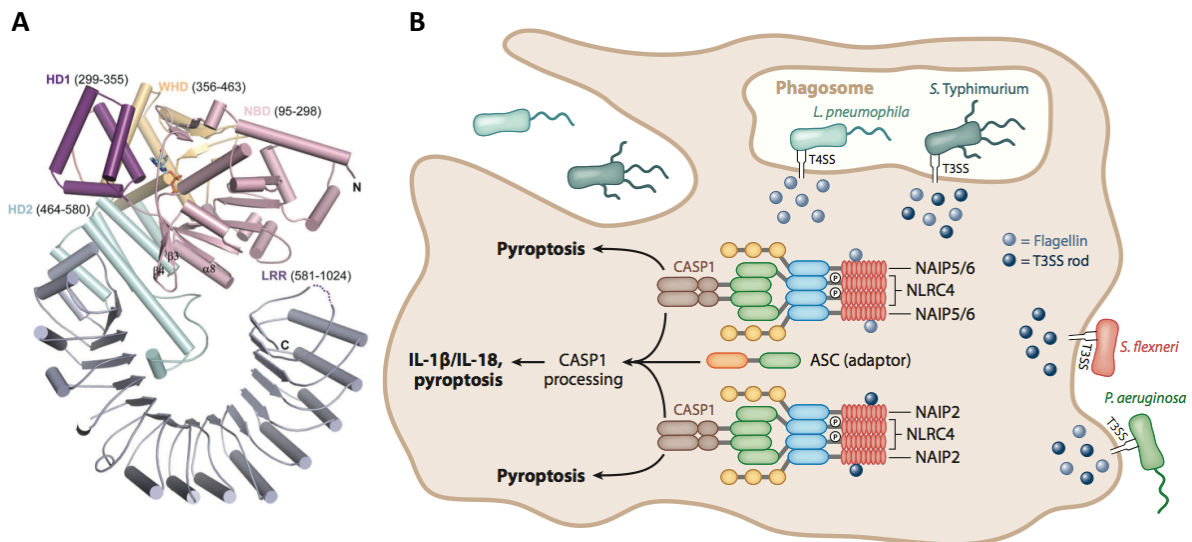


Figure 8 : Structure et activation du NLRC4-inflammasome.

### b. Mécanismes d'activation

NLRC4 (IPAF, CLAN ou CARD12) a été identifié grâce à sa similarité structurale avec APAF-1. NLRC4 est capable de recruter la caspase-1 en réponse à son activation par de nombreux pathogènes comme *Salmonella Typhimurium*(117), *Legionella pneumophila*(118), *Listeria monocytogenes*(101), *Shigella flexneri*(119) et *Pseudomonas aeruginosa*(120).

#### i. La flagelline

Le principal ligand bactérien permettant l'activation de NLRC4 est le flagelle, particulièrement une séquence de 35 acides aminés de la région D0 de la partie C-terminal de la flagelline(59,60). La mutation de cette partie de la flagelline abolit la reconnaissance par NLRC4. Cette partie est par contre différente de la région D1 de la flagelline, reconnue par



TLR5(82), un récepteur de la membrane cellulaire. Il n'existe pas d'interaction directe de la flagelline avec NLRC4(121). En plus de la flagelline, NLRC4 est activé par les systèmes de sécrétion bactériens, et particulièrement le système SP-1 de *S. Typhimurium*(86) et le système Dot/Icm de *L. pneumophila* (20)(Figure 9). Comme nous l'avons vu, le rôle principal de ces systèmes de sécrétion est de transloquer des exotoxines dans le cytoplasme de la cellule hôte, mais de nombreuses études suggèrent que ces systèmes de sécrétions peuvent aussi transloquer des fragments de facteur de virulence comme la flagelline(122), permettant l'activation des NLR(84,99). Cette translocation de la flagelline semble accidentelle et ne pas relever d'une stratégie d'échappement pour toutes les bactéries. En effet, l'habitat naturel de *L. pneumophila* est représenté par les amibes qui n'expriment pas NLRC4(79). En revanche, pour des pathogènes communs de nombreux mammifères come *S. Typhimurium* ou *L. monocytogenes*, la répression de l'expression de la flagelline semble être un mécanisme d'échappement au système immunitaire de l'hôte(20).

### **ii. la protéine interne de l'aiguille du SST3**

De nombreuses bactéries non-flagellées comme *S. Flexneri* sont capables d'activer NLRC4(86). Dans ces situations c'est une protéine de la paroi interne de l'aiguille des SST3 bactériens qui est impliquée dans l'activation de NLRC4 (Figure 8)(123). A l'instar de la région D0 de la flagelline, la protéine interne de l'aiguille adopte une structure secondaire en forme d'hélice  $\alpha$ , qui s'oligomérisse sous la forme d'un cylindre, pour former le canal excréteur central, mais la composition en acide aminé entre la région D0 et la protéine interne du SST3 est très différente. Pour *P. aeruginosa*, la protéine PscI du SST3 a été identifiée comme un ligand potentiel pour NLRC4 (Figure 8)(120).

### **iii. les adaptateurs NAIP (NLR family apoptosis inhibitory protein)**

Comme nous l'avons évoqués dans les deux paragraphes précédents, les ligands bactériens n'interagissent pas directement avec NLRC4 et nécessitent la présence d'un autre NLR, appelé NAIP, servant d'adaptateur entre le ligand bactérien et NLRC4(124). A l'heure actuelle, deux adaptateurs NAIP ont été identifiés chez la souris. NAIP5 interagit avec la flagelline et NAIP2 interagit directement avec la protéine interne du SST3 (Figure 8) (121,125).

### iii. L'activation de NLRC4 nécessite la PKC $\delta$

En plus de la liaison au complexe ligand-NAIP, l'activation de NLRC4 nécessite la phosphorylation de la sérine en position 533 par une kinase appelée PKC $\delta$  (protéine kinase de type C isoforme  $\delta$ )(97). Le rôle de la PKC $\delta$  a d'ores et déjà été démontré mais il semble probable que d'autres kinases puissent activer NLRC4. A l'heure actuelle, nous ne savons pas si la phosphorylation a lieu avant la liaison au complexe ligand-NAIP pour démasquer un site d'intérêt ou après pour contrôler l'activation du NLRC4-inflammasome.

Les protéines kinase C sont des sérine/thréonine kinases et sont considérées comme des régulateurs de l'inflammation. L'inhibition totale ou sélective de certains isoformes de PKC permet d'obtenir un effet anti-inflammatoire protecteur dans de nombreux modèles de lésion pulmonaire aiguë, primaires (lésion associée à la ventilation mécanique) ou secondaires (modèle de pancréatite, de péritonite)(126). En plus de cette activité, les PKC sont impliquées dans les voies de réparations des barrières endothéliales, le contrôle du recrutement des neutrophiles et la régulation de la barrière alvéolaire épithéliale(126). En plus ce nouveau rôle dans la phosphorylation de NLRC4, ces propriétés font des PKC, des cibles thérapeutiques d'intérêt.

#### *c. Rôle de NLRC4 dans le contrôle des bactéries intracellulaires*

Comme nous l'avons vu précédemment, l'inflammasome joue un rôle clé dans le contrôle et la clairance des bactéries intracellulaires. Dans de nombreux modèles infectieux, aussi bien digestif (*S. typhimurium*, *S. flexneri*, *L. monocytogenes*), pulmonaire (*L. pneumophila*, *L. monocytogenes*) voire systémique (*L. monocytogenes*, *B. cepacia*) Les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> montraient une susceptibilité accrue à l'infection, présentant une diminution de la survie et une diminution de la clairance bactérienne(116).

#### *d. Rôle de NLRC4 dans la reconnaissance de P. aeruginosa*

##### **i. in vitro**

NLRC4 est impliquée dans la reconnaissance intracellulaire de la flagelline de *P. aeruginosa*(127). En effet, la délétion du gène FliC codant pour la flagelline sur la souche PAO1 et la souche PAK diminue significativement l'activation de l'inflammasome(128). Le SST3 semble aussi impliqué dans l'activation de NLRC4 et deux mécanismes sont alors possibles. Le premier serait une activation directe par une protéine constitutive du SST3. En

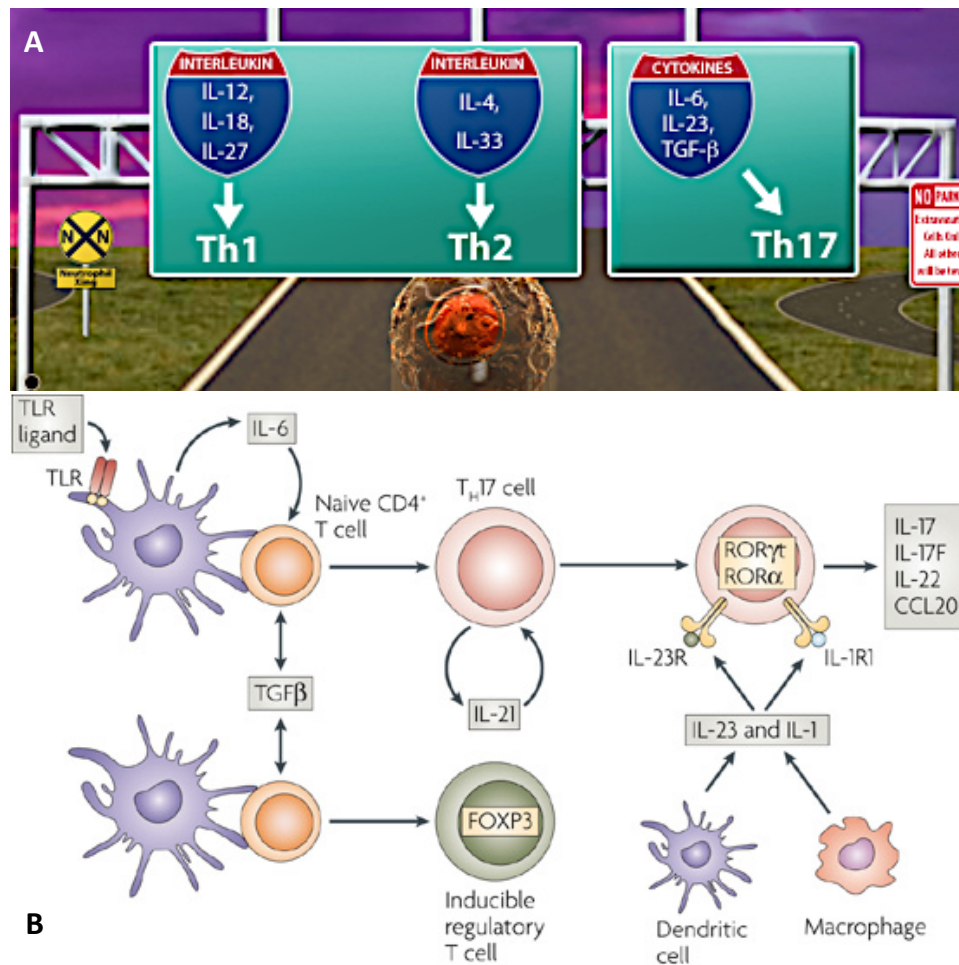
effet, une étude suggère que la protéine PscI du SST3, identifiée par analogie avec la région D0 de la flagelline(120), est un ligand potentiel de NAIP2/NLRC4 mais à ce jour aucune analyse cristallographique n'a confirmé cette hypothèse. Encore une fois, aucune étude n'a montré d'interaction directe entre une protéine de l'aiguille purifiée et le complexe NAIP2/NLRC4. Le deuxième mécanisme possible serait une activation par translocation de la flagelline par le SST3 dans le cytoplasme de la cellule de l'hôte à l'instar de *S. typhimurium* ou *L. pneumophila*. Ainsi l'activation de NLRC4 par le SST3 de *P. aeruginosa* ne nécessiterait pas la protéine PscI mais tout simplement un SST3 fonctionnel capable de transloquer la flagelline en plus des exotoxines. Une étude récente réalisée chez *Pseudomonas syringae*(122) (infectant la plante du tabac) semble corroborer cette hypothèse.

## ii. *in vivo*

Le rôle du NLRC4-inflammasome *in vivo* dans des modèles infectieux murins a été étudié deux fois : La première fois dans un modèle de péritonite à *P. aeruginosa* utilisant la souche PA103 (souche aflagellée) ne retrouvant pas de différence significative en dehors d'une augmentation de la dissémination bactérienne chez *P. aeruginosa*(127) ; La seconde fois, dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë avec la souche PAK à une dose très faible ( $5.10^5$  UFC/souris)(129). Là encore, aucune différence significative n'a été observée par les auteurs. Enfin le rôle des cytokines dépendantes de l'inflammasome a été étudié *in vivo*. Bien que l'IL-1 $\beta$  joue un rôle important(130) dans le contrôle des infections à *P. aeruginosa*, l'IL-18 semble jouer un rôle délétère(131).

## Chapitre 4 : La voie Th17 : la réponse transitionnelle.

### 1) Généralités



**Figure 9 : Les différentes polarisations des cellules T et l'activation de la voie Th17. A, Les cytokines impliquées dans la différenciation des cellules Th1, Th2 et Th17. B, Principales cellules présentatrices d'antigène et cytokines impliquées dans la différenciation de la voie Th17.**

Récemment, une population distincte de cellules T a été mise en évidence, les cellules Th17 en plus des cellules Th1 et Th2 mieux connues<sup>(132)</sup>. Ces cellules Th17 ont bousculé les dogmes, se plaçant à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative dans une réponse appelée réponse transitionnelle (Figure 9A)<sup>(133)</sup>. Les cellules Th17 proviennent de la différenciation de cellules T CD4<sup>+</sup> naïves grâce à la stimulation du facteur de transcription STAT3 en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$  chez la souris, et d'IL-6 et d'IL-1 chez l'homme (Figure 9B)<sup>(132)</sup>. Les cellules Th17 peuvent ensuite produire un grand nombre de cytokines différentes : l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22 par activation du facteur de transcription

nucléaire ROR $\gamma$ t(134) (retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t) par STAT3(132). Cette nouvelle voie a été impliquée dans le domaine des maladies infectieuses et la réponse anti-infectieuse de l'hôte, dans l'asthme allergique, mais également dans le domaine des pathologies inflammatoires du tube digestif comme la maladie de Crohn (IL-17A)(135), neurologiques comme la sclérose en plaque (IL-17A et F) ou de pathologies auto-immunes comme le Lupus érythémateux disséminé (IL-17x) et le psoriasis (IL-22)(136).

#### *a. Rôle de l'IL-17A et l'IL-17F*

Parmi les nombreuses cytokines de la famille IL-17 (IL-17A, B, C, D, E et F), l'IL-17A et l'IL-17F ont des rôles similaires. En effet IL-17A et L-17F conduisent à la sécrétion de facteurs de croissances cellulaires (G-CSF, GM-CSF) ainsi que la production de nombreuses chimiokines de type CXC. Elle permet aussi le recrutement vers les foyers infectieux de polynucléaires neutrophiles, cellules clés de la réponse de l'hôte contre les bactéries extracellulaires, permettant d'éliminer les pathogènes via la production de ROS, d'enzymes protéolytiques ou de peptides antimicrobiens. Ces deux cytokines sont produites par un contingent bien défini de cellules T CD4<sup>+</sup> appelées cellules Th17. Cependant, bien que les cellules T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle primordial dans la réponse adaptative de l'hôte, certains autres types cellulaires sont capables de sécréter de l'IL-17A dans les phases précoces de la réponse innée, faisant la liaison entre immunité pulmonaire innée et adaptative. Ces autres types cellulaires sont composés des lymphocytes T  $\gamma\delta$ (137), Natural Killer (NK), des cellules NKT(138) et les innate lymphoid cells (ILCs)(139). L'IL-17A et l'IL-17F utilisent le même récepteur mais le rôle primordial de l'immunité Th17 dans les infections bactériennes extracellulaires a été démontré pour l'IL-17A et l'IL-17F(132). La principale différence entre ces deux cytokines se situe au niveau de leur régulation. En effet l'expression de l'IL-17A nécessite Ikt (133)(inducible T cell kinase), un médiateur de l'activation du TCR, alors que l'expression d'IL-17F est indépendante.

#### *b. Rôle de l'IL-22*

L'IL-22 est un membre de la famille des IL-10-cytokines(140). En effet, le récepteur de l'IL-22 est un hétérodimère composé de l'IL-22R1 et IL-10R2(141). De nombreuses études ont démontré que les cellules T étaient responsables de la sécrétion d'IL-22. De plus les lymphocytes T mémoires sont capables pour une même stimulation d'exprimer et de sécréter plus d'IL-22 qu'une cellule T naïve(142). Les principales cellules impliquées dans la

sécrétion d'IL-22 en dehors des cellules T CD4<sup>+</sup> sont les cellules T CD8<sup>+</sup>, les cellules T $\gamma\delta$ , les cellules NK ainsi que les Innate Lymphoid cells (ILCs) (143). Plus récemment, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques CD11c<sup>+</sup>(144) ont montré leur capacité à produire de l'IL-22 lorsqu'elles sont stimulées à la fois par du LPS et de l'IL-23, impliquant cette cytokine dans la réponse innée et adaptative. L'IL-22 possède de nombreuses fonctions : elle est impliquée dans la réparation des épithélia et particulièrement l'épithélium pulmonaire chez l'humain ainsi que l'expression de peptides antimicrobiens par les épithéliums digestifs, cutanés et pulmonaires(143). Une étude récente a démontré que la sécrétion concomitante d'IL-17A et d'IL-22 permettait d'augmenter l'expression de peptides antimicrobiens inductibles par les différents épithélia(145). Le rôle clé de l'IL-22 a d'ores et déjà été démontré dans des modèles de pneumonie aiguë à Gram négatif, et particulièrement, *Klebsiella pneumoniae*(142). En effet, les souris *IL-22*<sup>-/-</sup> étaient plus susceptibles à l'infection et présentaient une augmentation de la charge bactérienne et de la dissémination bactérienne secondaire(142).

### *c. Rôle de l'IL-23*

Une autre cytokine, l'IL-23 est impliquée aux temps tardifs dans le développement des cellules Th17 permettant de faire perdurer cette réponse et d'induire la production d'IL-17A(134). L'IL-23 fait partie de la famille des IL-12-cytokines, comprenant l'IL-12 et l'IL-23. Chaque cytokine est un hétérodimère comprenant l'IL-12p70 pour l'IL-12 et l'IL-23p19 pour l'IL-23, associé à l'IL-12p40(146). Ces cytokines font partie des cytokines de la réponse transitionnelle permettant l'interface entre réponse immune innée et adaptative(133,143). Elles sont produites par des cellules de l'immunité innée comme les macrophages ou les cellules dendritiques(144) et permettent le contrôle des cellules Th1 par l'IL-12 (IL-12p70) et Th17 par l'IL-23 (IL-23p19). Outre sa capacité à promouvoir la sécrétion d'IL-17 par les autres types cellulaires, l'IL-23 permet le recrutement précoce de polynucléaires neutrophiles et semble primordiale dans la réponse pulmonaire anti-infectieuse(147). Cet axe IL-23/IL-17 a cependant d'autres implications dans le domaine des maladies auto-immunes comme dans l'encéphalite auto-immune.(132) Dans les voies aériennes, l'IL-23 conduit à la sécrétion d'IL-17A par les cellules possédant un IL-23R comme les invariant NKT (iNKT), les innate lymphoid cells (ILC) ainsi que les lymphocytes T  $\gamma\delta$ (148).

## 2) Types cellulaires impliqués dans la production de cytokines de la voie Th17

### *a. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ( $\gamma\delta$ T)*

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont des cellules T hautement spécialisées(149). Leur population représente 1 à 5% du compartiment lymphocytaire total chez l'humain comme chez la souris. C'est le premier type de cellule T produite pendant l'ontogénèse par le thymus et dont la survie dépend de l'IL-7(150). En effet les précurseurs thymiques exprimant le plus de récepteurs à l'IL-7 (IL-7R) se différencieront en lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Lors de la maturation fœtale, le nombre de cellules T exprimant un TCR  $\gamma\delta$  reste constant tandis que le nombre de cellules T exprimant un TCR de type  $\alpha\beta$  augmentera rapidement pour agrandir le répertoire lymphocytaire. Ces lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont reconnus comme la première ligne de défense de la réponse immune innée contre les infections de part leur localisation stratégique dans les zones vulnérables et sensibles d'interface avec le milieu extérieur comme la peau, les poumons ou le tube digestif(149). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent reconnaître un nombre important de signaux de danger car expriment en plus de nombreux TLRs et permettent de contrôler la réponse inflammatoire par l'intermédiaire de molécules pro-apoptotique comme le FasL(150). Ces cellules de la réponse transitionnelle, à l'interface entre immunité innée et adaptative possèdent ainsi certaines propriétés de la réponse adaptative comme le réarrangement génique VDJ(150).

### *b. Les cellules NK et NKT*

Les cellules NK sont des cellules de l'immunité innée se distinguant par deux rôles : d'une part, leur cytotoxicité grâce à la production de granzyme et l'expression d'un récepteur de mort. D'autre part, par leur capacité de production de cytokines activant d'autres cellules immunitaires professionnelles(151). Les cellules NK utilisent leurs récepteurs « activateurs (ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif)» ou « inhibiteurs (ITIM immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)» pour réguler leur propre fonction. En effet le récepteur activateur reconnaît un signal de danger et active la cellule, le récepteur inhibiteur reconnaît le soi comme le complexe majeur d'histocompatibilité. Ces cellules ont d'ores et déjà démontré leur implication dans la sécrétion d'IL-22 et possèdent le facteur de transcription ROR $\gamma$ T(151). La sécrétion d'IL-17 par les NK semble principalement dépendante de l'IL-6 en l'absence de l'IL-23R(132).

Les cellules NKT sont des lymphocytes T exprimant un marqueur de cellule NK à leur surface comme le NK1.1(138). Ces cellules reconnaissent des antigènes lipidiques et les présentent par l'intermédiaire du CD1d. Les NKT se divisent en deux groupes selon leur expression du TCR et leur réponse à un ligand : le  $\alpha$ galactosylceramide (aGalCer). Les iNKT (invariant NKT cells) expriment un TCR et sont activées par le aGalCer(138). Ils sont capables de produire de l'IL-17 en réponse à la stimulation du TCR et en l'absence d'IL-6. Les CD4-/NKT1.1+ NKT ont été récemment décrits comme des producteurs d'IL-17 mais le mécanisme à l'heure actuelle n'est pas connu.

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

Les ILCs sont des cellules lymphoïdes présentes au niveau des muqueuses (pulmonaires, digestives) jouant un rôle dans la réponse immune innée(139). Elles sont proches des lymphocytes T helper et des cellules NK car elles possèdent un rôle important dans la sécrétion de cytokines telles que l'IL-17(A et F), l'IL-22. Elles expriment donc le facteur de transcription ROR $\gamma$ T ainsi que l'IL-23R et CCR6(139).

#### *d. Les macrophages*

Les macrophages sont capables de produire de l'IL-17 dans de rares circonstances(152). Dans la réponse immune anti-infectieuse, la stimulation de TLR2 (comme le peptidoglycane ou le zymosan) permettait d'obtenir une production d'IL-17A par les macrophages. Les macrophages alvéolaires sont aussi impliqués dans la production d'IL-22 en réponse à certaines endotoxines comme le LPS de *E. Coli* dans des modèles animaux(144).

### **3) Voie Th17 au cours des infections bactériennes pulmonaires**

#### *a. Staphylococcus aureus*

Le rôle de l'IL-17 dans l'immunité pulmonaire est donc très souvent protecteur en initiant le recrutement des neutrophiles, et en activant la phagocytose conduisant à la clairance du pathogène. En effet la diminution du recrutement des neutrophiles dans les poumons en réponse à *Staphylococcus aureus* chez les souris *IL-17RA*<sup>-/-</sup> conduit à une diminution de la clairance bactérienne comparée aux souris *Wt*(148,153). Les mêmes résultats sont obtenus chez les souris *IL-22*<sup>-/-</sup>, *IL-17A*<sup>-/-</sup> et *IL-17F*<sup>-/-</sup>. Une étude plus récente a mis en évidence le rôle



primordial des Lymphocytes T CD4  $\gamma\delta$  dans la sécrétion des cytokines de la voie Th17. De plus, lorsqu'une souris *Wt* est préalablement infectée avec le virus de la grippe (influenza A) avant l'infection à *S. aureus*, la pneumonie à *S. aureus* secondaire est significativement aggravée par rapport à la pneumonie virale seule ou à la pneumonie à *S. aureus* seule, présentant une diminution significative de la clairance bactérienne et une augmentation de la lésion pulmonaire. Le mécanisme de cette aggravation est la capacité du virus Influenzae à inhiber l'axe IL-23/IL-17 et inhiber ainsi la clairance bactérienne dépendante de la voie Th17(154).

#### *b. Klebsiella pneumoniae*

Des résultats similaires ont été retrouvés dans des modèles murins de pneumonie aiguë à *K. pneumoniae*. En effet, les souris *IL-17R<sup>-/-</sup>* présentaient un retard de recrutement des neutrophiles dans les poumons, diminuant la clairance bactérienne pulmonaire et augmentant la dissémination bactérienne pulmonaire évaluée par les cultures spléniques. Une diminution du G-CSF de MIP-2 et de CXCL2 était observée(146).

Cette étude a aussi confirmé le rôle de l'IL-23 dans l'initiation et la pérennisation de la réponse Th17 dans un axe IL-23/IL17. En effet les souris *IL-23p19<sup>-/-</sup>* montrent une mortalité exacerbée par rapport aux souris *Wt* lors d'une infection pulmonaire à *K. pneumoniae*. Par contre les souris *IL-23p19<sup>-/-</sup>* recevant de l'IL-17A recombinante murine par voie endotrachéale après 12 heures d'infection présentent une survie, une clairance bactérienne et une dissémination bactérienne secondaire identiques aux souris *Wt*(146).

#### *c. Streptococcus pneumoniae et vaccination*

L'IL-17 a enfin montré un rôle primordial dans la réponse de l'hôte contre le pathogène pulmonaire le plus fréquent, *S. pneumoniae*. Plusieurs vaccins ont été développés contre ce pathogène et la protection induite était significativement diminuée chez les souris *IL-17A<sup>-/-</sup>* comparées aux souris *Wt*, *IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>* et *IL-4<sup>-/-</sup>*, deux autres cytokines particulièrement impliquées dans la réponse adaptative nécessaire à l'obtention d'une immunité vaccinale(155). Enfin, dans une autre étude, une immunisation par voie intra-nasale des souris obtenue grâce à des antigènes de *S. pneumoniae* permettait de prévenir la colonisation des voies aériennes par *S. pneumoniae* par une voie Th17-dépendante. En outre, l'administration d'anticorps anti-IL-17A par voie intra-péritonéale annulait cet effet. Cette étude illustre l'implication de la voie Th17 non seulement dans l'immunité innée, permettant aux épithélia de surface d'éliminer

rapidement et précocement *S. pneumoniae* mais aussi dans l'immunité adaptative en permettant d'obtenir une réponse durable par la stimulation de cellules mémoires(134,155).

#### **4) Voie Th17 et infection pulmonaire à *P. aeruginosa***

L'IL-17 est donc critique dans la réponse de l'hôte dans les infections aiguës pulmonaires dues à des bactéries extracellulaires. Par contre, l'IL-17 joue un rôle délétère dans les infections chroniques suppuratives respiratoires comme la mucoviscidose et particulièrement dans les infections chroniques à *P. aeruginosa*(148). En effet, la réponse immune de ces patients est caractérisée par un recrutement massif de polynucléaires neutrophiles dans les voies aériennes associés à des dommages tissulaires importants. Les patients atteints de mucoviscidose présentent des taux élevés d'IL-23 et d'IL-17 dans les crachats. L'inhibition de l'IL-23, modélisée dans un modèle murin d'infection chronique permet de diminuer de façon significative l'inflammation dans les voies aériennes (KC, IL-6 et MMP-9) et permet d'envisager l'IL-23 comme une cible potentielle de thérapie immunomodulatrice(156). Contrairement à ce rôle délétère, l'axe IL-23/IL-17 joue un rôle bénéfique dans les infections respiratoires aiguës à *P. aeruginosa*(157). En effet, une sécrétion majeure d'IL-23 conduit à la sécrétion d'IL-17 dans un modèle murin de pneumonie aiguë. Elle est observée précocement en réponse à *P. aeruginosa*. Les souris traitées avec un anticorps anti-IL-17 montraient une diminution significative du recrutement des neutrophiles et une augmentation des lymphocytes dans les poumons. La charge bactérienne pulmonaire était augmentée d'environ 100 fois dans le groupe recevant l'anticorps anti-IL-17(157,158). Ainsi, la réponse transitionnelle Th17 semble participer à l'immunité vaccinale contre *P. aeruginosa*(159).

#### **5) Voie Th17 et peptides antimicrobiens**

Liang *et al* ont récemment montré que les cellules Th17 et particulièrement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> étaient responsables de la co-sécrétion d'IL-17A en réponse à l'IL-6, et d'IL-22 en réponse à l'IL-23(145). *In vitro et in vivo*, l'IL-17A comme l'IL-22 conduisent à l'expression de peptides antimicrobiens, de plus l'IL-17A et d'IL-22 agissent synergiquement pour augmenter l'expression de peptides antimicrobiens par l'épithélium, particulièrement les  $\beta$ -défensines(145).

## Chapitre 5 : Les peptides antimicrobiens

### 1) Généralités

Le système immunitaire comprend un vaste arsenal de mécanismes impliquant des cellules professionnelles ou non-spécifiques interagissant ensemble pour protéger l'hôte. Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont des peptides cationiques de petite taille protégeant l'hôte contre de nombreux micro-organismes(160). Certains sont d'ailleurs utilisés en pratique clinique comme les polymyxines B et E(10). Ces peptides sont produits par les procaryotes (les bactéries, les plantes) mais aussi par les eucaryotes (fungiques, vertébrés) et représentent ainsi des molécules extrêmement anciennes et conservées dans l'évolution chez les mammifères(160). Environ 1500 PAMs ont été mis en évidence à travers les différentes espèces et sont rassemblés au sein d'une même database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). La classification de ces PAMs est difficile compte tenu de leur extrême diversité. La classification la plus simple repose sur leur propriété structurale. En effet, certains peptides possèdent une hélice  $\alpha$  comme les cathélicidines humaines (comme LL-37)(161) ou les  $\alpha$ -défensines(162), les autres possèdent un feuillet  $\beta$  stabilisé par des ponts disulfures comme les  $\beta$ -défensines humaines(161). Les peptides antimicrobiens sont exprimés par les cellules des épithéliums des principales interfaces avec le milieu extérieur comme la peau, les poumons et le tube digestif, permettant de prévenir la colonisation de ces barrières par les pathogènes(160). Ces peptides sont conservés dans des granules à l'intérieur du cytoplasme. En dehors de leur effet bactéricide, les PAMs permettent la neutralisation des endotoxines et ont des propriétés proches des chimiokines. Les PAMs participent à la réponse inflammatoire, sont immunomodulateurs, sont impliqués dans l'angiogenèse et la réparation tissulaire. Le mécanisme d'action des peptides antimicrobiens n'est pas totalement élucidé. En effet, deux modèles sont suggérés par les différentes études, d'une part l'interaction directe des PAMs chargés positivement avec les phospholipides membranaires chargés négativement conduisant à des disruptions dans la membrane cellulaire ; D'autre part, la formation de canaux ioniques perméabilisant la cellule. Enfin une dernière catégorie considérée comme des PAMs est constituée par les protéines Regenerating islet-derived protein (Reg3 $\alpha,\beta,\gamma$ )(143). Ces molécules sont sécrétées par les cellules de Paneth et par conséquent strictement sécrétées par l'épithélium digestif et ne jouent aucun rôle dans l'immunité pulmonaire(163).

## 2) Les cathélicidines

Les cathélicidines sont trouvées dans les granules des neutrophiles et dans certaines cellules épithéliales. Une cathélicidine, nommée LL-37 est exprimée chez l'homme et joue un rôle lors des infections cutanées par le streptocoque de groupe A(161) et possède aussi une activité bactéricide sur *P. aeruginosa*. LL-37 neutralise l'endotoxine du streptocoque, bloquant sa fixation aux cellules CD14-positives et la libération de cytokines(162).

## 3) Les $\alpha$ -défensines et les $\beta$ -défensines

Les défensines humaines existent en tant qu' $\alpha$  et  $\beta$ -défensines, en fonction de leurs séquences. Il y a six  $\alpha$ -défensines humaines (hAD-x) et quatre  $\beta$ -défensines humaines (hBD-x)(161).

### a. Les $\alpha$ -défensines

Les  $\alpha$ -défensines sont produites par les neutrophiles et certains épithélia humains comme la muqueuse vaginale et digestive. Les hAD-1 à 4 sont produites par les macrophages, les neutrophiles et les cellules NK. Ces molécules sont stockées dans des granules et sécrétées au site inflammatoire lors de la stimulation cellulaire. hAD-5 et 6 sont produites par les cellules de Paneth dans le tube digestif(164). En plus de leurs propriétés antimicrobiennes, les  $\alpha$ -défensines possèdent quelques autres propriétés. Elles induisent la production d'IL-8 par les cellules épithéliales, la dégranulation des mastocytes, et elles améliorent la phagocytose par les cellules mononuclées(161).

### b. Les $\beta$ -défensines

hBD-1 est exprimé de façon constitutive et est présent dans le plasma. Les souris déficientes en mBD-1 (murine  $\beta$ -défensines 1), correspondant à hBD-1 présentent une capacité réduite pour lutter contre une infection pulmonaire par *Haemophilus influenza*(165). hBD-2 et 3 sont produites par les cellules épithéliales lors de la stimulation par l'IL-17(165). La production d'hBD-2 par les cellules épithéliales est également amplifiée suite à une activation via TLR4(166). Les propriétés antimicrobiennes des défensines ont été largement décrites. hBD-2 est efficace contre les bactéries à Gram-négatif et *Candida albicans*, hBD-3 joue un rôle contre *Staphylococcus aureus*. Les  $\beta$ -défensines permettent l'attraction des cellules dendritiques et des lymphocytes T sur les sites infectieux(161).

#### **4) Peptides antimicrobiens humains et peptides antimicrobiens murins**

Il n'existe pas de corrélation directe entre des PAMs murins et humains. En effet bien que l'on retrouve la classification  $\alpha$ -défensines,  $\beta$ -défensines et cathélicidines chez la souris il n'y a pas de correspondance directe entre souris et humains(166). La répartition, l'activité bactéricide et les mécanismes de régulations sont très différents et varient en fonction des organes.

#### **5) Les peptides antimicrobiens dans l'immunité pulmonaire.**

Les  $\beta$ -défensines humaines comme les  $\beta$ -défensines murines contribuent à l'immunité innée de l'épithélium respiratoire. En effet, hBD-1, 2 et 3 exercent leur activité sur un antigène polysaccharidique de la capsule et le LPS des bactéries à Gram négatif comme *K. pneumoniae*(167). Ces mêmes hBDs ont montré une activité bactéricide sur *P. aeruginosa*. A l'instar de ces deux bactéries à Gram négatif, hBD-2 et 3 possèdent une activité bactéricide sur *S. pneumoniae*(168). Chez la souris les  $\beta$ -defensines murines constituent la majeure partie des PAMs pulmonaires. Elles sont sécrétées par l'épithélium respiratoire. Bien que mBD-1 soit exprimée de façon constitutive par l'épithélium respiratoire, l'expression de PAMs inductibles est augmentée sous l'action de l'IL-17A et de l'IL-22 comme pour mBD-2,3,4 et 10(145). Parmi celles-ci mBD-2,3 et 4 ont montré une activité bactéricide sur *P. aeruginosa*(160,166).

Chez la souris, les  $\alpha$ -défensines sont produites par les neutrophiles et semblent contribuer à augmenter les lésions induites par les neutrophiles sur la barrière alvéolo-capillaire (bdeir). Enfin parmi les cathélicidines, CRAMP (l'équivalent murin de LL-37) est produite par les neutrophiles et possède une activité anti *Pseudomonas*(162,169).

## **Chapitre 6 : Une réponse immune adaptée et contrôlée détermine le pronostic de l'hôte**

### **1) La théorie dommage-réponse : « The damage-response framework of microbial pathogenesis »**

L'émergence de nombreuses pathologies infectieuses ne touchant pas les individus immunocompétents montre que les concepts actuels de pathogénicité et de virulence ne prennent pas assez en compte le fait que l'hôte autant que le micro-organisme contribuent à la pathogénèse de l'infection et à la symptomatologie consécutive(170). Cette constatation nécessite donc de nouvelles approches théoriques pour comprendre les interactions hôte pathogène. Une de ces théories est connue sous le nom de théorie « dommage-réponse ». Cette théorie repose sur 3 principes : 1. La pathogénèse des infections microbiennes est due à l'interaction entre l'hôte et le micro-organisme. 2. Le pronostic de l'hôte est déterminé par la gravité des dommages tissulaires issus de l'interaction hôte pathogène. 3. Les dommages tissulaires induits sont dus à la fois au pathogène mais aussi à la réponse de l'hôte(170). Dans ce cadre, le résultat des interactions entre l'hôte et un micro-organisme peut être bénéfique ou néfaste soit pour le micro-organisme soit pour l'hôte soit pour les deux à la fois. Par exemple le mutualisme et le commensalisme sont deux exemples d'interaction à la fois bénéfique pour l'hôte et le micro-organisme (Figure 8) (170). Ici, un agent pathogène est défini comme étant un micro-organisme qui est capable de causer des dommages à un hôte mais ces dommages ne sont pas forcément liés au micro-organisme lui-même et varie donc selon le statut immunitaire de l'hôte. En effet, ces dommages peuvent être induits par une réponse immunitaire excessive et entraîner une symptomatologie clinique voire le décès de l'hôte(170). De ce fait les interactions permettant la clairance ou le contrôle du microorganisme sans dommage pour l'hôte représente une base pour le développement de vaccins et d'immunothérapies. Ainsi l'interaction hôte-microorganisme peut être représentée comme une courbe « dommage-réponse » (Figure 8) (170).

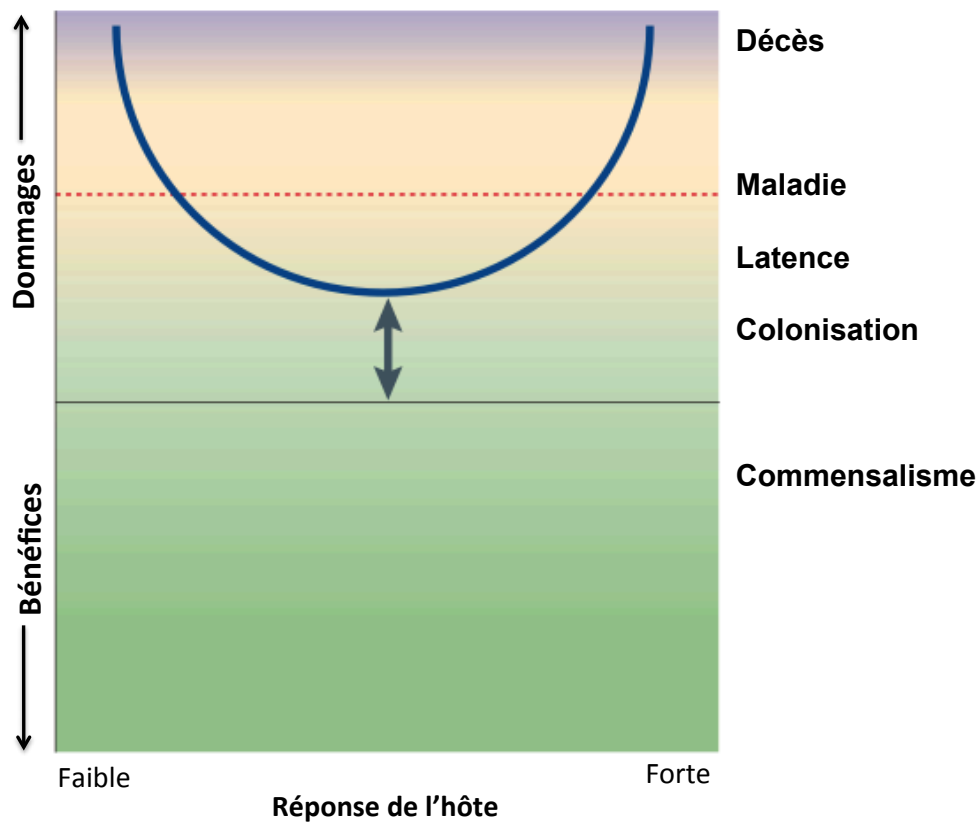


Figure 10 : La courbe dommage-réponse de l'interaction hôte-pathogène

## 2) Le syndrome de détresse respiratoire aiguë : Acute Lung Injury

### *a. la perméabilité alvéolo-capillaire pour estimer la lésion pulmonaire induite par l'interaction hôte-pathogène*

La cellule sentinelle de l'immunité innée est le macrophage alvéolaire(75,171). Lorsqu'un signal de danger est détecté par les macrophages alvéolaires, ceux-ci s'activent et sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires(19). C'est le départ de la réponse alvéolaire immunitaire. Les cytokines et chimiokines sécrétées vont entraîner le recrutement majoritairement de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes. Ce phénomène local va ensuite se généraliser entraînant alors un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS). Bien que le SRIS soit physiologique, une réponse non régulée et inadaptée peut devenir délétère et conduire à léser l'organe(172). Dans le poumon : C'est le syndrome de détresse respiratoire aiguë ou Lésion pulmonaire aiguë (acute lung injury, ALI). Les premières causes d'ALI restent les pneumonies virales et bactériennes(173).

Dans la phase aiguë, l'étude histologique montre un œdème interstitiel et alvéolaire associés à une accumulation de polynucléaires neutrophiles, de macrophages et de globules rouges dans les alvéoles(174). Il existe ainsi une augmentation de la perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire due à des lésions d'un côté sur l'épithélium alvéolaire et de l'autre côté sur l'endothélium(175). Cette augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire quantifiable dans les modèles murins permet donc d'estimer la lésion pulmonaire induite par la réponse de l'hôte en réponse au microorganisme(174).

*b. Le recrutement excessif de neutrophiles contribue à la lésion pulmonaire*

Le rôle des neutrophiles dans la lésion pulmonaire aiguë consécutif à une infection bactérienne doit être mis en balance avec le rôle primordial des polynucléaires neutrophiles dans la clairance bactérienne(176). La gravité de ces lésions dépendra de la l'intensité et de la durée du processus inflammatoire mais pourra engager le pronostic vital du patient si il perdure. En effet, en conditions normales, les neutrophiles traversent l'épithélium pulmonaire et pénètrent dans les voies aériennes où ils phagocytent et détruisent les bactéries grâce aux ROS, aux peptides cationiques(177), aux métalloprotéases et leurs autres enzymes protéolytiques contribuant ainsi à la clairance bactérienne(178). Lorsque ce recrutement est excessif, les neutrophiles(173,179) exercent leur activité lytique sur les cellules épithéliales détruisant les jonctions serrées et induisant l'apoptose et la nécrose des cellules alvéolaires de type I et de type II (Figure 9).



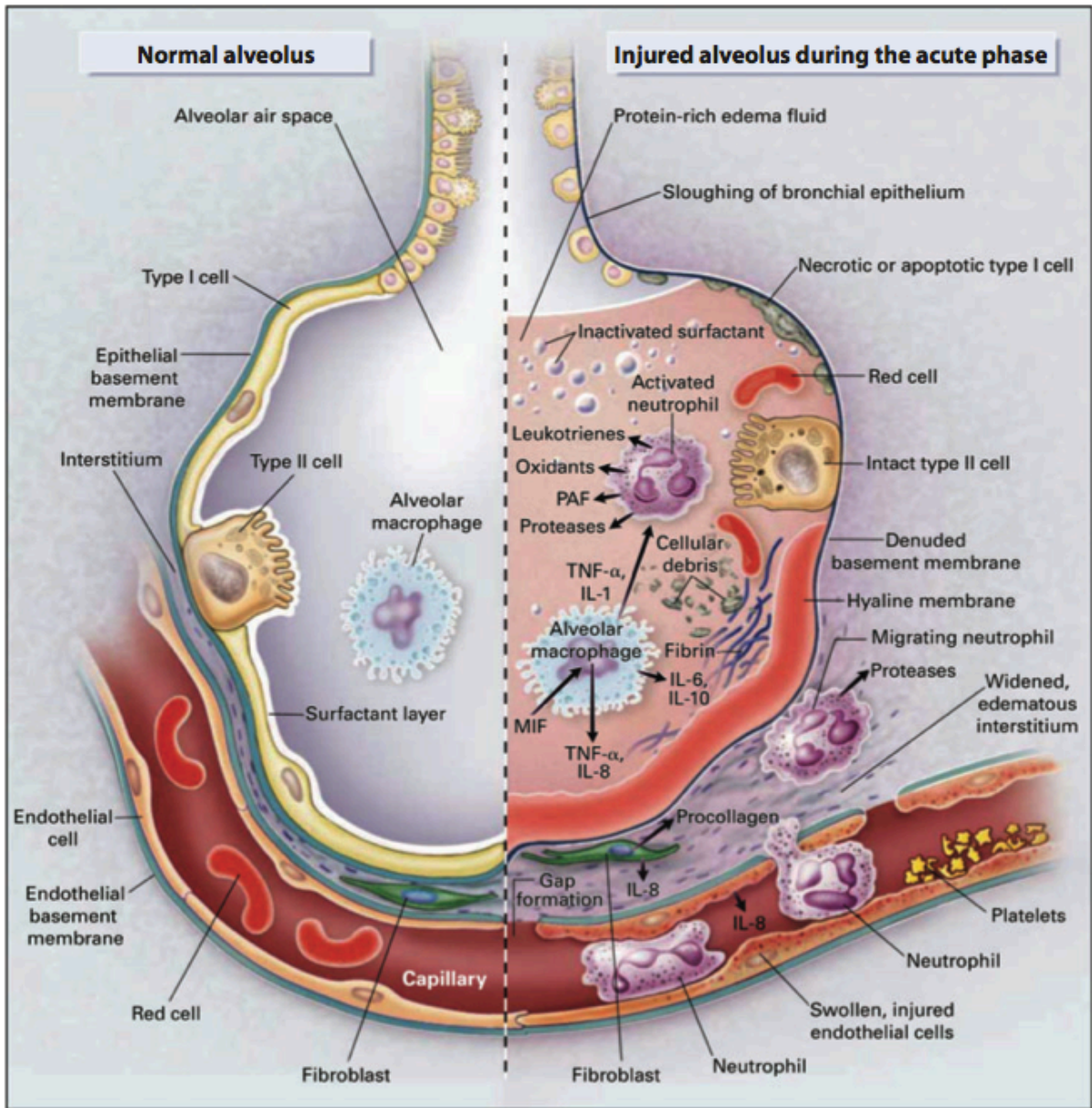


Figure 11 : Mécanismes impliqués dans la lésion pulmonaire aiguë (ALI)

*c. Rôle de l'inflammasome dans la lésion aiguë pulmonaire*

Ce recrutement est finement orchestré. Il dépend de la sécrétion de chimiokines et de la fonctionnalité de leurs récepteurs. De nombreuses chimiokines sont impliquées dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles comme CXCL2, CXCL5, CXCL8(172,175). Les souris *CXCR2*<sup>-/-</sup> présentent une survie augmentée dans les ALI secondaires à une infection bactérienne faisant de CXCR2 une cible pour une thérapeutique immunomodulatrice(78). Enfin de nombreux modèles murins ont montré l'implication de cytokines pro-inflammatoires

comme l'IL-6, l'IL-8 et le TNF $\alpha$  dans les lésions inflammatoires observées dans les voies aériennes pulmonaires. Plus récemment, l'implication de l'inflammasome dans la genèse de l'ALI a été étudiée(180,181). En effet l'inflammasome permet la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 matures, deux cytokines pro-inflammatoires impliquées dans le recrutement des neutrophiles dans les alvéoles pulmonaires. Une étude récente réalisée à la fois dans un modèle murin et chez des patients hospitalisés en réanimation présentant les critères diagnostiques de l'ALI, montre, d'une part, une augmentation de la sécrétion l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 respectivement dans les séra et les surnageants des lavages bronchoalvéolaires des souris(180) et d'autre part, une augmentation des transcrits de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-18 et de la caspase-1 dans les cellules mononuclées périphériques du sang humain(180). L'activation de l'inflammasome contribue donc au développement de l'ALI, favorisant les dommages tissulaires chez l'hôte et assombrissant le pronostic vital à court terme(182).

## **Chapitre 7 : Objectifs de ce travail**

L'inflammasome a montré un rôle central dans le développement d'une réponse immune précoce et efficace contre les bactéries à développement intracellulaire, en les exposant grâce à la pyroptose, aux cellules phagocytaires professionnelles permettant ainsi leur élimination et la survie de l'hôte. Bien qu'il soit démontré que *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie *extracellulaire*, active l'inflammasome grâce à son système de sécrétion de type 3 (SST3), le rôle *in vivo* de l'inflammasome, système de détection intracellulaire, n'a en revanche jamais été étudié au cours d'infections par bactéries extracellulaires telle que *P. aeruginosa*.

Dans un premier temps nous avons comparé les différentes souches de *P. aeruginosa in vitro* pour identifier la souche permettant d'activer au mieux l'inflammasome (par la sécrétion d'IL-1 $\beta$ ) et faciliter l'analyse *in vivo*.

Dans un second temps nous avons étudié le rôle de différents inflammasomes en comparant *in vitro* la sécrétion des cytokines dépendantes de la caspase-1 (IL-1 $\beta$  et IL-18) dans un modèle utilisant des macrophages péritonéaux issus de souris *Wt* et déficientes pour différents NLR.

Puis, après avoir identifié une souche d'intérêt (CHA) et le NLR d'intérêt, NLRC4. Nous avons développé un modèle d'agression pulmonaire aiguë afin de comparer la réponse immune entre souris *Wt* et déficiente pour NLRC4.

## Partie 2 : Matériels et Méthodes

### Chapitre 1 : Souches, plasmides et oligonucléotides

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

##### a. Souche CHA

La souche de *P. aeruginosa* du laboratoire est la souche CHA(69). Elle a été isolée au CHU de Grenoble, à partir d'un lavage broncho-pulmonaire de patient atteint de mucoviscidose(69). Cette souche adopte un phénotype mucoïde dans les conditions de culture du laboratoire et possède un système de sécrétion de type III actif *in vivo*, dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez la souris, et *in vitro*, par une déplétion du milieu en calcium ou un contact cellulaire. Elle dispose des gènes codant les exotoxines du SSTT : ExoS, ExoT, ExoY, mais ne possède pas le gène codant ExoU. Son phénotype de résistance aux antibiotiques est celui d'une souche sauvage, n'ayant pas acquis de modes de résistance supplémentaires : pas de résistance aux carboxypénicillines; pas de résistance aux autres aminosides que la kanamycine et pas de résistance à la tétracycline.

##### b. Souche PAO1

PAO1 est la souche de laboratoire internationale de référence. Ses caractéristiques d'intérêt pour notre étude sont résumées dans le tableau ci-dessous. Le génome de *P. aeruginosa* souche PAO1 a été entièrement séquencé en 2000. L'annotation des gènes est disponible sur le site internet [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com). Il s'agit d'un des plus grands génomes bactériens connus avec 6,3 méga bases codant 5570 cadres de lecture.

##### c. Souche PAK

PAK est une souche de laboratoire dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau ci-dessous. PAK diffère de PAO1 au niveau de la partie FliD du flagelle. Seulement deux types de protéines FliD associées respectivement aux deux types de Flagelline des souches PAK et PAO1 ont été recensées jusqu'à présent(58,60). Cette particularité fait de cette souche un modèle d'intérêt en immunologie.

#### *d. Souches PA14 et PA103*

Ces deux autres souches de laboratoire sont particulièrement étudiées car possèdent l'exotoxine U, leur conférant une virulence majeure chez l'hôte. Le génome de PA14 a d'ailleurs été entièrement séquencé en 2005 et cette souche partage 96,3% de son génome avec PAO1(183). Celui-ci est disponible sur le site internet [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com).

<b>Souche</b>	<b>SST3</b>	<b>Exotoxines</b>	<b>Flagelle</b>	<b>Source</b>	<b>Publications</b>
<b>PAO1</b>	+	S, T, Y	+	Laboratoire	Chemani <i>et al</i> (184)
<b>PAK</b>	+	S, T, Y	+	Laboratoire	Dacheux <i>et al</i> (70)
<b>PA103</b>	+	U, T, Y	-	Laboratoire	Ohman <i>et al</i>
<b>PA14</b>	+	S, T, Y	+	Laboratoire	Rahme <i>et al</i> (185)

Tableau 1 : Caractéristiques du SST3 et du flagelle des souches de *P. aeruginosa* utilisées dans cette étude

#### *e. Souche clinique : PA1293*

La souche PA1293 a été obtenue du Laboratoire « Cellular and Molecular Pharmacology Unit », Université catholique de Louvain, Belgique, et a été isolée lors d'une pneumonie aiguë associée à la ventilation mécanique dans le service de réanimation de l'hôpital Erasme, Bruxelles, Belgique. Cette souche a été utilisée car elle possède une résistance acquise à la colistine (CMI = 16) permettant d'évaluer l'effet anti-inflammatoire de la colistine en s'amendant de l'effet bactéricide sur la bactérie.

#### *f. Souches mutantes de CHA*

Pour étudier l'implication de NLRC4, du SST3, des exotoxines et du flagelle, dans notre modèle d'agression pulmonaire aiguë, nous avons utilisé des souches mutantes de la souche CHA obtenue en mutagenèse par échange allélique. Les souches obtenues sont résumées dans le tableau suivant.

Souches	Nom complet	Amorces ou phénotype	origine	Publication
CHA	CHA	souche mucoïde sauvage	TheREx	Toussaint <i>et al</i>
CHAΔS	CHAΔ <i>exoS</i> :: Gmlox	5'-GGCCCAGGATCGGCTTGCAA-3' 5'-GATCCGCTGCCGAGCCAAGA-3'		Cette étude
CHAΔT	CHAΔ <i>exoT</i> :: Gmlox	5'-GCGACGGCGCCCTGAAATCGCTGGCCACCG-3' 5'-GCGGTGGCCAGCGATTTCAGGGCGCCGTCGC-3'		Cette étude
CHAΔSTY	CHAΔ <i>exoST</i> :: <i>lox</i> Δ <i>exoY</i> ::Gmlox	Souche ΔS délétée du gène de l'exo T.	TheREx	Cette étude
CHAΔpcrV	CHAΔ <i>pcrv</i> :: <i>lox</i>	Souche délétée de la protéine de soutien du SST3	I. Attrée	Goure <i>et al</i> ,
CHAΔpopB	CHAΔ <i>popBD</i> :: <i>lox</i>	Souche délétée des deux protéines du translocon	TheREx	Goure <i>et al</i> ,
CHAΔexsa	CHAΔ <i>exsa</i> :: <i>lox</i>	Souche délétée du gène du régulateur transcriptionnel du SST3	TheREx	Dacheux <i>et al</i> ,
CHAΔFliC	CHAΔ <i>flic</i> :: Gmlox	5'-TCGAGCTCGGCCCTTACAGTCAACACGAAC-3' 5'-GAGGATCCTTAGCGCAGCAGGCTCAGG-3'		Cette étude
CHAΔpopB	CHAΔ <i>popbd</i> :: <i>lox</i> Δ <i>Flic</i> :: Gmlox	5'-TCGAGCTCGGCCCTTACAGTCAACACGAAC-3' 5'-GAGGATCCTTAGCGCAGCAGGCTCAGG-3'	I. Attrée	Cette étude

Tableau 2 : Souches mutantes de CHA obtenues par mutagenèse plasmidique

## 2) Souche de *Escherichia coli*

Souches	Génotypes et caractéristiques	Source
<i>E. coli</i> DH5α	Φ80 <i>dlacZDM15F-endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub> thi-1 λ-recA1 yrA96 relaA1 Δ (argF-lacZYA) U169</i> . Cellules compétentes pour la transformation des plasmides.	Invitrogen
<i>E. coli</i> S17-1	<i>Rp4-2-tc::Mu aph::TN7 recA [SmR]</i> Souche donneuse pour conjugaison biparentale.	Simon <i>et al.</i> , 1983

Tableau 3 : Souches d'*E. coli* utilisées pour les échanges alléliques

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

Les souches utilisées sont cultivées en milieu de Luria-Bertani (Sigma-aldrich, France) à 37°C pendant 12 heures. Les souches sont ensuite calibrées par densitométrie optique à 600 nm (Amersham, General electric healthcare, Life science, UK). Les souches d'*E. coli* sont conservées à -80°C dans du milieu de culture additionné de glycérol 40 % (v/v). Les souches de *P. aeruginosa* sont conservées également à - 80°C sur des supports microbilles (tubes PROTECT Bacterial Preservers, Technical service consultant Limited, UK) inoculés à partir de culture sur gélose.

#### 4) Antibiotiques utilisés :

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

Antibiotiques	<i>E. Coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Liquide	Gélose	Liquide	Gélose
<b>Gentamicine</b>	10 µg/mL	10 µg/mL	200 µg/mL	200 µg/mL PA01 400 µg/mL CHA
<b>Carbénicilline</b>	-	-	300 µg/mL	300 µg/mL PA01 600 µg/mL CHA
<b>Ampicilline</b>	100 µg/mL	100 µg/mL	-	-
<b>Kanamycine</b>	50 µg/mL	50 µg/mL	-	-
<b>Tétracycline</b>	20 µg/mL	20 µg/mL	250 µg/mL	150 µg/mL PA01 250 µg/mL CHA

Tableau 4 : Principaux antibiotiques utilisés

#### 5) Plasmides et vecteurs

Les plasmides et vecteurs utilisés dans cette étude sont listés dans le tableau ci-dessous :

Plasmide	description	origine	Publications
<b>pEX100TlinkΔHindII</b>	Ampicilline-R pEX100T avec site de multiclona	TheREx	Quenée et al, 2005(187)
<b>pUCGmlox Apr, Gm<sub>r</sub></b>	vecteur contenant le gène <i>aacCI</i> flanqué des séquences <i>lox</i>	TheREx	Quenée et al, 2005(187)
<b>pTOPO</b>	Vecteur de clonage	Invitrogen	
<b>pUCP20</b>	Vecteur de clonage mobilisable dans <i>E. Coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> Apr (Cbr).	TheREx	West et al, 1994
<b>pCM157 Tc<sub>r</sub></b>	Séquence codant la recombinase Cre	TheREx	Marx et al 2002

Tableau 5 : Principaux plasmides utilisés pour les mutants de délétion obtenus à partir de la souche CHA

## **Chapitre 2 : Techniques de biologie moléculaire**

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

La réaction de PCR s'effectue dans un thermocycleur automatique (Master cycler gradient, eppendorf, Germany) et commence par une dénaturation de la matrice à 95°C pendant 2 à 5 min, suivie de 30 cycles de synthèse et se termine par une étape d'élongation de 10 min à 72°C. Un cycle de synthèse est constitué de trois étapes : 1 - Dénaturation de l'ADN double brin, 95 °C de 45 secondes à 5 min. 2 - Hybridation des amorces sur la matrice à  $T_m - 4$  °C, 45 secondes. La température d'hybridation ( $T_m$ ) dépend de la richesse en bases C et G des amorces et de leur degré de complémentarité avec la matrice. Elle se calcule selon la formule suivante (basée sur la séquence commune à l'amorce et à la matrice) :  $T_m = 4^\circ C \times (G+C) + 2^\circ C \times (A+T)$ . 3 - Elongation par l'ADN polymérase à partir des amorces. La durée est dépendante de l'ADN polymérase utilisée et de la longueur de la séquence à amplifier (1 min pour 1 kb). Cette amplification est essentiellement utilisée à deux fins : disposer d'une séquence pour un clonage ou détecter un évènement : présence d'une séquence, taille d'une séquence, etc. Pour faciliter les clonages des fragments de PCR, des sites de restriction sont rajoutés aux extrémités des amorces. Deux températures d'hybridation sont alors utilisées. La première est calculée sans tenir compte des séquences des sites de restriction rajoutées qui ne s'hybrident pas à la matrice, 5 cycles de synthèse sont alors effectués en début de réaction avec celle-ci. Puis 25 cycles sont effectués avec la seconde température d'hybridation correspondant à la totalité de la longueur des amorces.

### **2) Électrophorèse de l'ADN**

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose dans un tampon TAE (Tris 40 mM, acide acétique 0,1 %, EDTA 2 mM, pH 8,5). La concentration d'agarose est dépendante de la taille des fragments à séparer. Dans la majorité des cas, nous utilisons des gels d'agarose à 1 % en tampon TAE, avec 1 µg/mL de bromure d'éthidium (BET). Les échantillons à déposer sur le gel sont, au préalable, additionnés de 1/5 (v/v) d'une solution de charge (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol FP 0,25 %, glycérol 30%) afin de visualiser la migration et d'augmenter la densité des échantillons pour les entraîner au fond du puits. Après une migration entre 25 et 100 V, selon la taille des échantillons, l'ADN est visualisé par fluorescence du BET sous ultraviolets (UV, 312 nm).

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

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

### **4) Digestion enzymatique**

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

### **5) Clonage**

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

#### *a. Sous-clonage*

Cette étape est utilisée pour disposer en quantités importantes d'un fragment d'ADN encadré par les sites de restriction voulus pour contrôler son insertion dans le vecteur. Le système utilisé dans ce travail est le système Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit® (Invitrogen, Carlsbad, CA) selon le protocole du fabricant du kit.

#### *b. Déphosphorylation*

Cette étape est utilisée lors du clonage d'un fragment d'intérêt dans un plasmide linéarisé afin d'empêcher la recircularisation du plasmide sans inclure l'insert. Ceci permet l'augmentation du rendement d'insertion du fragment d'intérêt. La phosphatase alcaline de crevette (*shrimp alkaline phosphatase*) possède une activité de déphosphorylation du phosphate en 5' d'un brin d'ADN. Si les deux extrémités d'un plasmide sont ainsi traitées, la ligation ne pourra pas



se faire entre elles, mais uniquement avec une extrémité non déphosphorylée, en l'occurrence celle du fragment à cloner. La réaction de déphosphorylation s'effectue généralement dans un volume total de 10 µl. Ceci est réalisé dans le tampon de l'enzyme avec 1 unité d'enzyme et 50 ng d'ADN à 37°C pendant 60 mn. Puis, l'enzyme est inactivée par incubation à 65°C pendant 15 mn.

### *c. Ligation*

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

## **6) Transformation des souches d'*E. coli* et *P. aeruginosa***

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

## **7) Préparation de l'ADN plasmidique**

Cette méthode implique trois étapes : la préparation d'une culture bactérienne, la récupération et lyse des bactéries et la purification du plasmide. La technique dite de « miniprep » permet une extraction et une purification d'ADN plasmidique rapide et simple à partir d'une culture liquide. Nous avons utilisé le kit QIAprep Miniprep (Quiagen, Hilden, Allemagne). L'ADN plasmidique est purifié par adsorption sur une colonne de silice.

## **8) Dosage des acides nucléiques obtenus**

Cette étape permet de vérifier que la taille des fragments d'acides nucléiques obtenus correspond à celle attendue lors du choix des séquences. L'électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée : si l'échantillon à doser ne contient pas assez d'ADN (<250 ng/mL) ou si ce dernier est fortement contaminé par des substances absorbant des ultraviolets. La quantité de fluorescence émise par le BET est proportionnelle à la masse totale de l'ADN. La quantité

d'ADN dans l'échantillon est estimée en comparant le niveau de fluorescence de l'échantillon et celui du marqueur de poids moléculaire. 1 à 5 ng peuvent être détectés par cette méthode.

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

L'échange allélique est effectué par une double recombinaison homologue entre les séquences homologues aux séquences flanquantes du gène d'intérêt. La technique utilisée est celle développée par Quénéé(187) . Elle repose sur l'utilisation d'un vecteur suicide, pEX100Tlink, incapable de se répliquer chez *P. aeruginosa*. Il possède un site de clonage multiple, le gène *bla3* qui confère une résistance à l'ampicilline et à la carbénicilline pour *P. aeruginosa* et le gène *sacB* qui induit une sensibilité au saccharose. Le produit du gène *sacB* est une enzyme permettant de dégrader le saccharose; il en résulte un dérivé toxique pour la bactérie.

#### **1) Échange allélique**

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

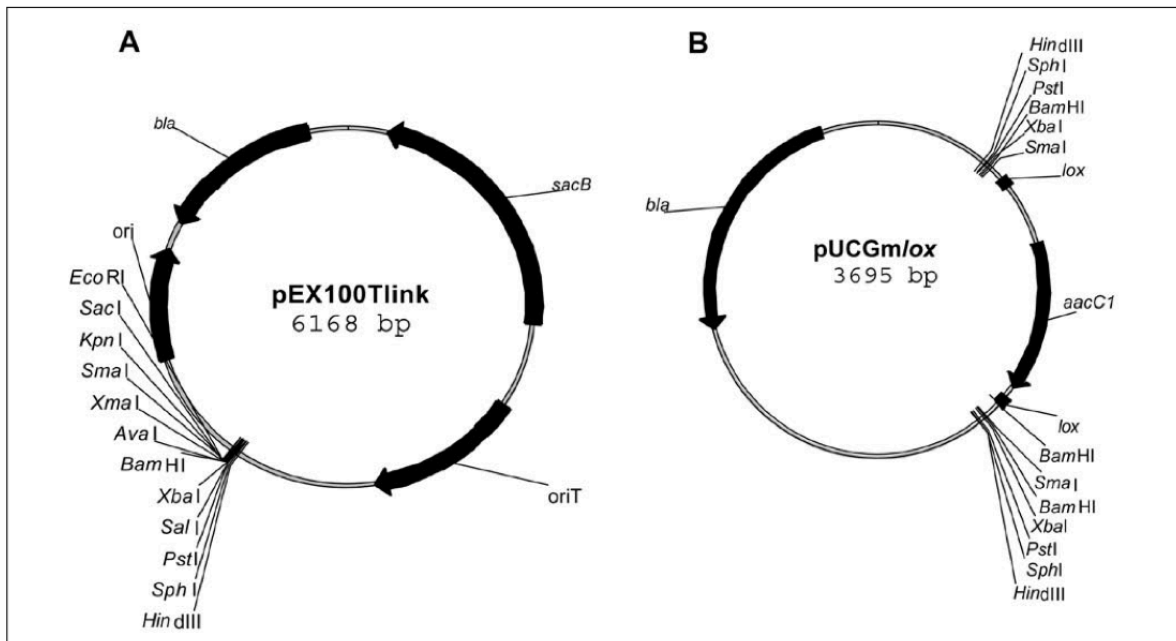


Figure 12 : Cartographies des plasmides pEX100Tlink et pUCGmlox

## 2) La conjugaison biparentale

La conjugaison biparentale est réalisée avec la souche d'*E. coli* S17.1 contenant le vecteur d'échange allélique. La souche d'*E. coli* et la souche de *P. aeruginosa* sont cultivées jusqu'à la phase exponentielle de croissance puis mélangées et déposées, sans étalement, sur le milieu LB gélosé sans NaCl. Après une nuit à 37°C, la culture est reprise dans 1 mL du milieu LB et étalée sur le milieu PIA contenant de la gentamicine. Le vecteur pEX100Tlink ne pouvant se répliquer dans *P. aeruginosa* (Figure 12), seules les souches ayant intégré la cassette *aacCI* par simple ou double recombinaison homologue entre les séquences flanquantes du gène d'intérêt pourront se développer sur ce milieu.

## 3) Sélection des clones « double recombinant »

L'évènement de recombinaison peut être simple ou double. Une simple recombinaison, entre une séquence flanquante du gène d'intérêt au niveau du plasmide et son homologue génomique entraîne l'insertion complète du plasmide pEX100Tlink, incluant les gènes *bla* et *sacB*, dans le génome. Chez ces clones simple recombinant (SR), le gène d'intérêt est reconstitué et non invalidé. Lors d'un évènement de double recombinaison homologue, un pour chaque partie flanquante du gène, le gène d'intérêt est remplacé par la cassette *aacCI*

sans incorporation des gènes *bla* et *sacB* dans le génome. Ce sont ces clones double recombinant (DR) que l'on cherche. En premier lieu, les clones recombinants, ayant incorporé dans leur génome la cassette *aacCI*, sont sélectionnés sur milieu PIA contenant de la gentamicine. La proportion de clones DR obtenue est variable selon le gène ciblé, en raison des différents niveaux de compaction de l'ADN qui rendent des zones du génome plus ou moins accessibles à la recombinaison. Puis, les colonies sont contre sélectionnées sur le milieu PIA avec 5% du saccharose grâce au gène *sacB*. Du fait de la toxicité qu'entraîne la présence de ce gène sur ce milieu, seuls les clones ayant éliminé *sacB* pourront se développer. Ceci se produit soit par réversion du premier événement de recombinaison, soit par un second événement de recombinaison conduisant à une souche DR. Ces clones contre sélectionnés sont ensuite repiqués sur milieu PIA gentamicine pour éliminer les révertants et sur PIA cabénicilline afin de sélectionner les clones DR. Ces mutants par insertion/délétion, avec un profil double recombinant, sont vérifiés par PCR sur ADN génomique.

#### **4) Excision de la cassette de résistance**

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

#### **6) Mutagénèse tri-parentale : obtention de souches exprimant la Green fluorescent protein (GFP)**

Les souches de *P. aeruginosa* d'intérêt ainsi que 2 souches de *E. coli* (une contenant le plasmide helper pRK2013, une souche S17 contenant le vecteur miniCTX-GFP) sont utilisées. Les 2 souches de *E. coli* sont étalées sous forme de goutte (30µL) sur des boîtes contenant un milieu LB sans sel pendant 2 heures. La souche de *P. aeruginosa* est mise à incubée sous agitation pendant 2 heures à 42°C. Puis 30 µL de milieu contenant la souche de

*P. aeruginosa* d'intérêt sont ajoutés sur la goutte contenant les souches de *E. coli*. Le temps de contact est de 4 à 6 heures. La goutte est récupérée avec 300 à 500 µL de LB liquide puis mise sous agitation à 200 rpm pendant 10 minutes à 37°C. Enfin 100 µL du mélange sont étalés sur milieu PIA (Pseudomonas Isolation Agar) supplémenté en Tétracycline (Tc200).

## **Chapitre 4 : Modèle murin d'infection pulmonaire**

### **1) Animaux**

Les animaux utilisés sont tous indemnes des microorganismes recherchés sur liste FELASA. Ils sont hébergés en portoir ventilé à l'institut Pasteur de Lille en secteur SOPF (specific opportunist pathogen free) avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les souris mâles *wild-type* et *knock-out* utilisées sont de fond génétique C57BL/6J. Les animaux contrôles proviennent des élevages de la société Janvier (Le Genest St-isle F-53941 Saint Berthevin) Les animaux transgéniques *Nlrc4<sup>-/-</sup>*, *Nlrp6<sup>-/-</sup>*, *Nlrp12<sup>-/-</sup>* et *caspase-1<sup>-/-</sup>* proviennent du centre d'élevage d'Orléans (Université d'Orléans UMR6218, Orléans, France) enfin les souris *Tlr5<sup>-/-</sup>* proviennent de l'institut Pasteur de Paris (Unité de Défense Innée et Inflammation, Institut Pasteur, F-75015 Paris, France). Tous les animaux sont âgés de 6 à 10 semaines.

### **2) Instillations intra-nasales**

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

### **3) Inocula bactériens des différents modèles**

Pour réaliser les différents modèles *in vivo*, agression pulmonaire aiguë et expérience de survie à 96 heures, différents inocula sont utilisés. Les inocula du modèle d'agression

pulmonaire aiguë ont été calibrés pour obtenir une lésion pulmonaire suffisante et une mortalité nulle à 24 heures et 48 heures. A l'inverse les inocula utilisés pour les expériences de survie, induisent une mortalité de 100% à 96 heures chez les souris *Wt* C57BL/6J. Le SST3 étant le facteur de virulence majeur dans les pneumonies aiguës, les souches ayant un SST3 non fonctionnel (*CHA* $\Delta$ *popBD* et *CHA* $\Delta$ *popBD* $\Delta$ *FliC*) sont utilisées à des inocula plus élevés pour induire une lésion plus importante. Les différents inocula sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Souches	Modèle (en UFC/souris)	
	Agression aiguë	Survie à 96 heures
<i>CHA</i>	5.10 <sup>6</sup>	1,5.10 <sup>7</sup>
<i>CHA</i> $\Delta$ <i>popBD</i>	5.10 <sup>7</sup>	1,5.10 <sup>8</sup>
<i>CHA</i> $\Delta$ <i>FliC</i>	5.10 <sup>6</sup>	néant
<i>CHA</i> $\Delta$ <i>popBD</i> $\Delta$ <i>FliC</i>	5.10 <sup>7</sup>	néant

Tableau 6 : Inocula des souches utilisés dans les modèles murins

#### 4) Thérapeutiques utilisées *in vivo*

Différentes thérapeutiques immunomodulatrices ont été testées *in vivo*. Les doses ont été établies en fonction des données de la littérature lorsque ces traitements ont été utilisés comme pour l'IL-18 et l'IL-18BP recombinante dans les modèles d'hépatites virales chroniques murines ou les anticorps anti-PKC $\delta$  dans les modèles murins de lésion pulmonaire aiguë secondaire à une péritonite inflammatoire. Les antibiotiques, polymyxine B et Colistine, ont été utilisés aux posologies usuelles présentes dans la littérature. La présence d'une lésion pulmonaire induite, favorisant le passage à travers la membrane alvéolo-capillaire, permet d'obtenir une diffusion augmentée du secteur plasmatique vers le secteur interstitiel et alvéolaire. Pour cette raison, la voie intra-péritonéale (IP) a été choisie dans certains modèles. De plus la voie intra-péritonéale chez la souris est plus facile d'accès et correspond à environ 4/5e de la dose intraveineuse. Pour les modèles utilisant des protéines recombinantes fragiles comme la PKC $\delta$  ou dans l'optique de tester un traitement local et obtenir des concentrations optimales dans l'alvéole, la voie intra-nasale (IN) a été préférée (colistine, polymyxine).

traitement	origine	posologie	voie	durée
<b>Anticorps anti-IL-17A</b>	C. Uyttenhove	100 µg/souris	IP	24 heures 1 injection/12h
<b>IL-18 recombinante</b>	MBL	500 ng/souris	IP	24 heures 1 injection/12h
<b>Anticorps anti-PKC<math>\delta</math></b>	Sino Biology	50 µg/souris	IP	24 heures 1 injection/12h
<b>PKC<math>\delta</math> recombinante</b>	Sino Biology	250 ng/souris	IN	24 heures 1 inhalation/12h
<b>IL-18 binding protein</b>	Life Sciences	50 µg/souris	IP	24 heures 1 injection/12h
<b>Polymyxine B</b>	Sigma-aldrich	4 mg/Kg/J	IN	24 heures 1 inhalation/12h
<b>Colistine</b>	Sanofi-Aventis	15mg/Kg/J (CMS)	IN	24 heures 1 inhalation/12h

Tableau 7 : Thérapeutiques immunomodulatrices utilisées dans les modèles in vivo

### 5) Mise à mort des souris

Le protocole a été validé par le comité d'éthique Nord-Pas de Calais. Les expériences ont été réalisées dans un établissement accrédité (N° B59-108) en accord avec la directive gouvernementale N°86/609/CEE. La mise à mort est réalisée à la 24<sup>e</sup> heure dans le modèle d'agression pulmonaire aiguë par un surdosage en Pentobarbital sodique 20% à la dose de 60 mg/Kg (CEVA laboratoire, France).

### 6) Modèle de survie à 96 heures.

Les souris sont instillées par voie intra-nasale selon les mêmes modalités fixées par le protocole d'instillation du modèle d'agression pulmonaire aiguë. L'inoculum utilisé est un inoculum létal préalablement établi. (cf section 3b, inocula bactériens). Les souris sont pesées toutes les 4 à 6 heures. La souffrance animale est évaluée selon le protocole établi par le comité d'éthique.

## 7) Modèle d'agression pulmonaire aiguë

### *a. Quantification de la charge bactérienne pulmonaire*

Après la mise à mort, nous procédons à une ouverture latéro-thoracique en rabattant la cage thoracique permettant de dévoiler le médiastin et les deux champs pulmonaires. Les poumons sont prélevés et homogénéisés dans 1 mL de SSI stérile dans un tube à hémolyse préalablement pesé. L'ensemble est repesé. L'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un broyeur, chaque échantillon est broyé avec précaution pendant 10 secondes et le broyeur est lavé selon un protocole comprenant quatre lavages (eau stérile, éthanol absolu, eau stérile, eau stérile). Les souches de *P. aeruginosa* sont dénombrées sur leur aspect visuel et au besoin par la positivité du test à l'oxydase après étalement de dilutions en série sur gélose BCP (Bromo Crésol Purple) et cultivées à 37°C pendant 24h. Le compte est rapporté au poids du poumon pesé pour chaque échantillon.

### *b. Dissémination bactérienne*

La rate est repérée par transparence du péritoine à jour frisant. Une incision de quelques millimètres est réalisée en regard et la rate est prélevée. La rate est ensuite déposée dans un tube à hémolyse contenant 1 mL de SSI puis broyée selon les mêmes modalités que le poumon. Les micro-organismes viables sont comptés après étalement de dilutions en série sur gélose Cétrimide et cultivés à 37°C pendant 24h.

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

Les souris, en décubitus dorsal, sont exsanguinées par coupure de l'artère fémorale, la trachée est exposée par méthode chirurgicale, le diaphragme est ouvert par une incision sur les piliers postérieurs et une aiguille de 24 Gauge (Popper & Sons, Inc., New Hyde Park, NY, USA) est introduite, via l'oropharynx, en endotrachéal. Cinq cents microlitres de SSI sont alors injectés dans la trachée puis récupérés, cette opération est répétée deux fois. Les 1,5ml de liquide de lavage broncho alvéolaire (LBA) sont conservés dans la glace jusqu'à leur utilisation. Le LBA est centrifugé 10 minutes à 250g. Le surnageant est prélevé, aliquoté puis conservé à -80°C.



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

La perméabilité est évaluée par la mesure du passage alvéolo-interstitiel d'albumine marquée à l'Iso-ThioCyanate de Fluoresceine (FITC) (Sigma-aldrich, France), injectée en intra-péritonéal(188) : la fluorescence pulmonaire mesurée est proportionnelle à la concentration d'albumine-FITC dans le sang et au degré de lésion de la barrière alvéolo-capillaire. Pour ce faire, 2 heures avant la mise à mort, 200 µl de SSI contenant 2 mg/ml d'albumine-FITC sont injectés par voie intra-péritonéale. Les souris sont ensuite sacrifiées puis exsanguinées par ponction du ventricule droit au moyen d'une seringue pré-héparinée. Les poumons sont prélevés et homogénéisés dans 1 ml de SSI. L'homogénat de poumon et le sang collectés sont alors centrifugés séparément à 1000g pendant 10 minutes. Un volume de 100 µl de chacun des surnageants est prélevé, et la fluorescence est mesurée sur chacun des échantillons (Excitation: 487nm, Emission:520nm ; Mithras LB 940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Un ratio est établi, permettant de calculer la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire.

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

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

Le culot cellulaire obtenu à l'issue du LBA est suspendu dans 1ml de SSI. Dix microlitres de cette suspension sont prélevés et mélangés à 10 µl de bleu trypan 0,04% (Invitrogen corporation, CA, USA). Une numération cellulaire est effectuée en cellule de Malassez. La formule est déterminée après dépôt sur lame de verre d'une monocouche cellulaire à partir de 200µl de cette suspension par centrifugation au cytospin (Cytospin shandon, Waltham, MA, USA), et coloration au May Grünwald Giemsa.

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

La mesure des taux d'interleukines dans les surnageants de LBA est réalisée à l'aide des kits Duoset de chez R&D (R&D, UK), selon les données du fabricant. Le test nécessite un anticorps de capture et un anticorps de détection. Une réaction colorimétrique utilisant la Streptavidine-HRP couplée à un anticorps est employée. La réaction est stoppée par une

solution d'acide sulfurique 2N (Sigma-aldrich, France). La lecture est réalisée par absorptiométrie aux longueurs d'onde de 450 nm et 540 nm sur un lecteur Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Les résultats obtenus sont ensuite comparés à une gamme étalon obtenue grâce à une protéine recombinante. Les échantillons sont testés en « triplicate » afin de ne pas méconnaître une erreur de mesure. Les différentes cytokines dosées sont : TNF $\alpha$  (DY410), IL-1 $\beta$  (DY401), IL-17 (DY421), IL-22 (DY582), IL-23 (DY1887), IL-6 (DY406), KC (DY453). Le dosage de l'IL-18 est réalisé grâce à un anticorps de capture (MBL, D047-3 utilisé au 1000<sup>e</sup>), l'IL-18 recombinante murine (MBL D045-3) et un anticorps anti IL-18 de détection couplé à la biotine (MBL, D048-6).

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

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

L'extraction de l'ARN total à partir des prélèvements de poumon sec est réalisée à l'aide du kit GeneJET RNA Purification Kit® (ThermoScientific, France), et selon le protocole indiqué par le fabricant. Dans un premier temps, les échantillons sont lysés et homogénéisés dans un tampon de lyse contenant du dithiothréitol (DTT) et un agent chaotropique (thiocyanate de guanidine) capable de protéger l'ARN de l'activité dommageable des ARNases. Dans un second temps, le lysat obtenu est mélangé à une solution contenant de la protéinase K et de l'éthanol puis est transféré dans une colonne en silice dite colonne de purification. Plusieurs étapes successives de centrifugation permettent alors de séparer l'ARN, retenu au niveau de la membrane de la colonne de purification, du reste du lysat. Par la suite, plusieurs lavages successifs à l'aide de tampons de lavage permettent d'éliminer les impuretés de la membrane. L'ARN pur est ensuite élué par ajout dans la colonne, d'eau sans ARNases.

La quantité d'ARN totale obtenue pour chaque échantillon est mesurée par densité optique à 260nm et 280nm au moyen d'un spectrophotomètre NanoVue Plus™ (GE Healthcare, France). La concentration de chaque échantillon est ensuite normalisée avec de l'eau sans ARNases afin d'obtenir une concentration finale homogène pour chaque échantillon de 25 ng/ $\mu$ l, avant l'étape de rétrotranscription. Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

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

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

### *c. PCR quantitative*

Elle est réalisée en chimie SYBR®Green, à l'aide du kit Brilliant II SYBR®Green QPCR Master Mix® (Agilent Technologies, France) sur un appareil thermocycleur Sequence Detection System 7500 (Applied Biosystems, France). Cette technique requiert l'utilisation d'un agent intercalant, le SYBR®Green, capable de se lier à l'ADN double brin par un mécanisme de liaison non défini. Lorsqu'il est en solution, cet agent émet peu de fluorescence. Son émission de fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Durant l'étape d'élongation, il se fixe à l'ADN double brin naissant, entraînant une augmentation de la fluorescence. L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle d'élongation et décroît lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. La spécificité de cette technique repose entièrement sur ces amorces. Pour définir la positivité de la PCR, on détermine le nombre de cycles à partir duquel un signal est détectable. Le moment d'apparition de ce signal est appelé cycle seuil ou Ct (*cycle threshold*). La validité de cette technique de PCR est objectivée par l'analyse de la courbe de fusion. Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion spécifique appelée *melting temperature* ou T<sub>m</sub>, définie comme étant la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme double brin, l'autre moitié sous forme simple brin. Cette T<sub>m</sub> est définie par un pic unique sur la dérivée primaire de la courbe de fusion. Ainsi, les amplicons aspécifiques dont la T<sub>m</sub> diffère de celle de l'amplicon d'intérêt peuvent être détectés par la présence de pics surnuméraires sur cette courbe de fusion.

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

*d. Amorces utilisées pour les PCR quantitatives.*

Les amorces sont obtenues grâce au logiciel Primer express software, version 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Les différentes amorces utilisées sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Gène	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>β-actin</i>	GAATGGGTCAGAAGGACTCCTATG	CCATGTCGTCGCCAGTTGGTAA
<i>mBD-1</i>	TCCTGGTGATGATATGTTTTCTTTCT	TGTTCTTCGTCCAAGACTTGTGA
<i>mBD-2</i>	GGAGGACAAATGGCTCTGACA	AAAGTATTGGATACGAAGCAGAACTTG
<i>mBD-3</i>	GGAACTCCACAACCTGCCAATC	TGAGGAAAGGAGGCAGATGCT
<i>mBD-4</i>	AACATGCATGACCAATGGAG	TCATCTTGCTGGTTCTTCATCT
<i>mBD-10</i>	TTGTCCTGGTAATAGCAGGTTTATGA	CGGAGATTCTCTGGGTGACAGT
<i>Reg3γ</i>	CGAGATGTCCTGAGGGTCTC	ACCTAAATCCTGGTTTCAAGC
<i>IL-6</i>	ACACATGTTCTCTGGGAAATCGT	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
<i>TNFα</i>	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	GTGGGTGAGGAGCACGTAGT
<i>KC</i>	GGCGCCTATCGCCAATG	TGGATGTTCTTGAGGTGAATCC

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour l'analyse des transcrits par PCR quantitative

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

Les données brutes de Q-PCR sont ensuite analysées par la méthode comparative du  $C_T$ , qui calcule l'expression relative du gène d'intérêt par rapport à un gène rapporteur de contrôle selon la formule  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Dans notre modèle murin, ce gène est celui de la  $\beta$ -actin. La formule utilisée est la suivante :

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

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

## **2) Analyses de la réponse cellulaire par Cytométrie en flux**

*a. Isolation des cellules alvéolaires et pulmonaires.*

Les poumons des souris sont collectés et hachés dans une boîte de Pétri stérile à l'aide d'un rasoir stérile. L'homogénat est repris dans du PBS supplémenté avec 2% de SVF (sérum de veau fœtal) et un antibiotique adapté. La préparation est fluidifiée grâce à des passages successifs dans des aiguilles de calibre de plus en plus réduit. Les homogénats sont ensuite soumis à l'action d'une collagénase à 0,1 mg/mL puis incubés à 37°C pendant 30 minutes au bain-marie. Les homogénats sont alors fluidifiés et filtrés à travers un filtre de nylon stérile de 70  $\mu\text{m}$  de diamètre. La solution obtenue est centrifugée à 1000g pendant 10 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite séparées en utilisant du Percoll 20% (2 mL de Percoll, 1mL de PBS 10X et 7 mL d'eau stérile). Les cellules sont centrifugées pendant 20 minutes à 250g. Le surnageant est jeté et les cellules sont récupérées. Les globules rouges sont lysées (Lysis Buffer, BDpharmigen, UK). Les cellules sont finalement énumérées sur cellule de Malassez. Cette étape est réalisée séparément pour les cellules pulmonaires totales et pour les cellules alvéolaires obtenues à partir des LBA.

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

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

- le panel d'anticorps identifiant les cellules présentatrices d'antigène (FITC-conjugated anti-Iab; PE-conjugated anti-F4/80; PerCP/Cy5-conjugated anti-CD103; PE/Cy7-conjugated anti-CD11c; APC-conjugated anti-CCR2; Alexa700-conjugated anti-CD86; APCH7-conjugated anti-LY6G; V450-conjugated anti-CD11b; V500-conjugated anti-CD45; ef605-conjugated anti-Ly6C)
- le panel d'anticorps identifiant les cellules lymphoïdes : antibody panel (FITC-conjugated anti-CD5; PE-conjugated anti-CD1.d tetramer; PerCP/Cy5-conjugated anti-NK1.1; APC-conjugated anti-CD25; Alexa700-conjugated anti-CD69; APCH7-conjugated anti-CD4; V450-conjugated anti-TCRb; V500-conjugated anti-CD8 and eF605-conjugated CD45)
- le panel d'anticorps identifiant les innate lymphoid cells (FITC-conjugated anti-Lin (cd3, cd11b ly6c ly6g ly76 cd45/220); PerCP/Cy5-conjugated anti-NK1.1; PE/Cy7-conjugated anti-CD127; Alexa700-conjugated anti-CD90.2; APC/H7-conjugated anti-CD4; ef605-conjugated anti-CD45)(139).

Les cellules sont incubées pendant 30 minutes puis lavées avec du PBS et sont ensuite suspendues dans du PBS 2% SVF. Pour chaque anticorps, un isotype est utilisé pour déterminer les compensations. Les cellules sont analysées sur un LSR Fortessa (BD Biosciences). Les analyses sont réalisées grâce au logiciel FlowJo 8.7 (Treestar, Sanford, CA, USA).

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

Pour le marquage intracellulaire, les cellules sont incubées pendant 4 heures avec 3 µg/mL de brefeldin A 1000X (eBioscience, San Diego, CA, USA), et lavées avec du PBS. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées selon le protocole du fabricant en utilisant le kit PermFix/PermWash (Franklin lakes, NJ, USA). Les marquages intracellulaires utilisés sont : APC-conjugated anti-IL-17A and PE-conjugated anti-IL-23 (eBioscience, San Diego, CA, USA). Pour chaque anticorps, un isotype est utilisé pour déterminer les compensations. Les

cellules sont analysées sur un LSR Fortessa (BD Biosciences). Les analyses sont réalisées grâce au logiciel FlowJo 8.7 (Treestar, Sanford, CA, USA).

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

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

Les macrophages péritonéaux sont recueillis après stimulation de leur différenciation par une injection intrapéritonéale de 2 ml de thioglycolate. A J5 après l'injection, les souris sont sacrifiées et les macrophages sont récoltés après trois lavages péritonéaux successifs par injection- réaspiration de 5 ml de PBS. Après centrifugation à 250g les macrophages sont suspendus dans des boîtes de pétri contenant du milieu de culture IMDM (Gibco, Life Sciences, United Kingdom) supplémenté en serum de veau fœtal (10%), pénicilline et streptomycine (Sigma-aldrich, France) puis placés en étuve à 37°C en atmosphère enrichie à 5% en CO<sub>2</sub>. Toutes les manipulations sont réalisées stérilement sous hotte à flux. A 5 heures d'incubation, le surnageant est éliminé et les macrophages sont décollés par méthode chimique (Versène, Gibco, Life Sciences, United Kingdom) et mécanique. Le milieu contenant les cellules est centrifugé, puis le culot est suspendu dans 1 ml de milieu. La concentration cellulaire est mesurée sur un hémocytogramme en cellule de Malassez après coloration au bleu trypan. La solution est ensuite calibrée pour obtenir une concentration de 5.10<sup>5</sup> cellules/ml. Puis elle est déposée sur plaque 96 puits à raison de 100 µl par puit soit 5.10<sup>4</sup> cellules par puit. Les cellules sont conservées en incubateur à 37°C et le milieu de culture est changé quotidiennement. Le jour de l'infection des macrophages, le milieu initial est remplacé par du milieu IMDM supplémenté avec 10% de SVF, sans antibiotique. Les macrophages sont pré-stimulés par 50 ng/mL de LPS pendant douze heures avant l'infection. Cette saturation de la voie NFκB conduit au premier signal (production pro-IL-1β et pro-IL-18) nécessaire à la production de cytokines matures par l'inflammasome. Ce premier signal sera donc indépendant de la souche bactérienne utilisée dans l'expérience. Les différences observées seront donc spécifiquement dues à l'activation de l'inflammasome. Les macrophages sont infectés avec les souches d'intérêt à MOI (MOI 10 ou 20 selon les expériences) dans 100 µL. Une fois le temps d'exposition souhaité écoulé, l'infection est stoppée par l'adjonction de Gentamicine (400 µg/mL) ou de Ceftazidime (200 µg/mL), cette dernière dépourvue d'activité bactéricide intracellulaire(189). Dans les expériences où les

bactéries extracellulaires doivent être éliminées, 7 lavages au PBS sont réalisés en plus du traitement antibiotique.

## **2) Analyse de la cytotoxicité**

Deux cents microlitres sont prélevés dans les surnageants des macrophages. Cinquante microlitres de ces surnageants sont déposés dans une plaque 96 puits (Nunc, life sciences, UK) et seront utilisés pour réaliser le dosage des LDH dans le surnageant. Dans la plaque de culture contenant les macrophages, 10µl de Triton X-100 1% (Sigma-aldrich, France) sont ajoutés dans chaque puit qu'on laisse incuber pendant 1 heure à 37°C afin d'obtenir une lyse cellulaire complète. Les 50µl résiduels dans chaque puit de la plaque contenant les lysats cellulaires sont transférés dans une plaque 96 puits pour réaliser le dosage des LDH cellulaires totales. Enfin, 50 µL d'un mix de réactif (Cytotoxicity assay kit, Roche, Suisse) sont ajoutés dans chaque puit de la plaque contenant 50 µl de surnageants ou 50 µL de lysats cellulaires. Les plaques sont laissées sous étuve à 37°C pendant 20 minutes pour permettre la réaction colorimétrique. Le dosage des LDH du surnageant et du produit de lyse cellulaire est réalisé par Absorbance, selon les recommandations du fabricant. La DO est lue immédiatement à 482 nm. Le pourcentage de lyse des macrophages est calculé par la formule suivante :

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

DO<sub>0</sub>= moyenne des surnageants des contrôles négatifs (non infectés).

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

Les surnageants de macrophages sont conservés à -80°C. Les dosages sont réalisés selon le protocole fourni par le fabricant (R&D, UK). Les différentes cytokines dosées sont : TNFα (DY410), IL-1β (DY401). Le dosage de l'IL-18 est réalisé grâce à un anticorps de capture



(MBL, D047-3 utilisé au 1000<sup>e</sup>), l'IL-18 recombinante murine (MBL D045-3) et un anticorps anti IL-18 de détection couplé à la biotine (MBL, D048-6)

#### **4) Western-Blot Caspase-1 inactive (p45) et caspase-1 activée (p10)**

Le Western-Blot à la recherche de la caspase-1 activée (p10) est réalisé pour affirmer l'activation de l'inflammasome. En effet les dosages de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 ne permettent pas de différencier les formes pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18, secondaires à l'activation du facteur NF $\kappa$ B, et l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 matures, secondaires à l'activation de l'inflammasome. Les Western-blot ont été réalisés en utilisant le système d'électrophorèse NuPAGE (Invitrogen). Les surnageants de macrophages ( $3,5 \cdot 10^6$  cellules, MOI 20, 4 heures d'infection) sont prélevés et sédimentés par centrifugation à faible vitesse puis remis en suspension dans un tampon RIPA (10 mM Tris-HCl pH 7,4). La teneur en protéines a été mesurée en utilisant le test de la protéine acide bicinchoninique (dosage de Bradford ; Pierce BCA réactifs, Pierce, Rockford, IL). Trente picogrammes de protéines ont été mélangés à un tampon 4X NuPAGE LDS de l'échantillon et NuPAGE 10X, puis chauffés pendant 10 min à 70°C. Après migration sur gel d'acrylamide (NuPAGE 12% Bis -Tris Gel, Invitrogen), les protéines sont électro-transférées sur une membrane PVDF (0.45, Pierce) , bloquée par une incubation de 1 à 5% de lait écrémé en Tris- solution saline tamponnée (TBS ; 20 mM Tris -HCl , 500 mM NaCl pH 7,5) contenant 0,1 % de Tween 20 . Les membranes ont ensuite été incubées pendant une nuit avec l'anticorps primaire à Caspase- 1 p10 ( SantaCruz biotechnologie , Santa Cruz, CA) ( dilué à 1 /100) anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (dilué au 1/5000) pendant 1 h . Un anticorps Anti-actine (Sigma- Aldrich) a été utilisé comme contrôle. Les transferts ont été révélés par chimioluminescence (SuperSignal Ouest Pico, Pierce) .

## 5) Microscopie confocale : Analyse de la pyroptose

La microscopie confocale permet de visualiser dans la cellule des éléments marqués avec un anticorps couplé à un fluorochrome. Cette technique est la seule publiée à l'heure actuelle pour identifier des marqueurs de la pyroptose<sup>(95)</sup>. Avant l'infection, la caspase-1 est marquée avec 10  $\mu$ L de FAM-FLICA (cf paragraphe *a. Collection et culture des macrophages péritonéaux*). Les cellules sont ensuite infectées pendant 2 heures ou 4 heures selon la souche à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite lavées et marquées par un anticorps anti- LAMP-1 à la concentration de 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L. Les cellules sont fixées grâce à du formaldéhyde 40% dilué au 10<sup>e</sup> dans de l'eau stérile et sont ensuite lavées par du PBS supplémenté avec 1% de SVF. Enfin les cellules sont marquées au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), dilué au 1000<sup>e</sup> dans du PBS + triton 1% avec un temps d'incubation de 2 minutes. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS 1% SVF et 10% SVF.

Antigène	Émission (nm)	Excitation (nm)	Marqueur
Adénine et thiamine	350	460	DAPI
LAMP-1	668	633	Alexa 647
Caspase-1	520	488	Alexa 488

Tableau 9 : Caractéristiques des fluorochromes utilisés en microscopie confocale

## 6) Cytométrie en flux : marquage de la caspase-1

Avant l'infection, la caspase-1 est marquée avec 10  $\mu$ L de 660-FLICA (cf paragraphe *a. Collection et culture des macrophages péritonéaux*). Les cellules sont ensuite infectées pendant 2 heures avec la souche CHA-GFP ou 4 heures avec la souche CHA $\Delta$ popBD-GFP à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules sont fixées grâce à du formaldéhyde 40% dilué au 10<sup>e</sup> dans de l'eau stérile et sont ensuite lavées par du PBS supplémenté avec 1% de SVF. Les contrôles et compensations sont effectués avec des cellules non infectées et infectées avec des souches n'exprimant pas la GFP. Les cellules sont analysées sur un LSR Fortessa (BD Biosciences). Les analyses sont générées grâce au logiciel FlowJo 8.7 (Treestar, Sanford, CA, USA).

	<b>Émission (nm)</b>	<b>Excitation (nm)</b>	<b>Marqueur</b>
<b>CD45</b>	415	500	V500
<b>Bactérie-GFP</b>	395	509	GFP
<b>Caspase-1</b>	633	680	Far Red (660-FLICA)

**Tableau 10 : Caractéristiques des fluochromes utilisés pour l'analyse par cytométrie en flux dans le modèle in vitro**

## **Chapitre 7 : Analyses statistiques**

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

## Partie 3 : Résultats

### Chapitre 1 : Choix de la souche de *P. aeruginosa* et du NLR d'intérêt.

#### 1) Choix de la souche de *P. aeruginosa*

L'expression des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* est dépendante du type d'infection, aiguë ou chronique mais dépend aussi du type de souche et de son phénotype. Nous avons donc testé, *in vitro*, l'activation de l'inflammasome de différentes souches de laboratoire de *P. aeruginosa* dont les caractéristiques principales sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Nom	Mucoïde	Flagelle	SST3	Exotoxine U
<i>PAO1</i>	-	+	+	-
<i>PA14</i>	-	+	+	+
<i>PA103</i>	-	-	+	+
<i>PAK</i>	-	+	++	-
<i>CHA</i>	+	+	+	-

Tableau 11 : Caractéristiques des souches de *P. aeruginosa* testées *in vitro*

Afin d'évaluer l'activation de l'inflammasome par ces souches, nous avons élaboré un protocole d'infection de macrophages récoltés sur des souris C57BL/6 mâles âgées de 6 à 8 semaines. Les macrophages alvéolaires sont les cellules sentinelles de l'immunité innée dans l'alvéole pulmonaire et les premières cellules immunitaires impliquées dans la réponse de l'hôte.

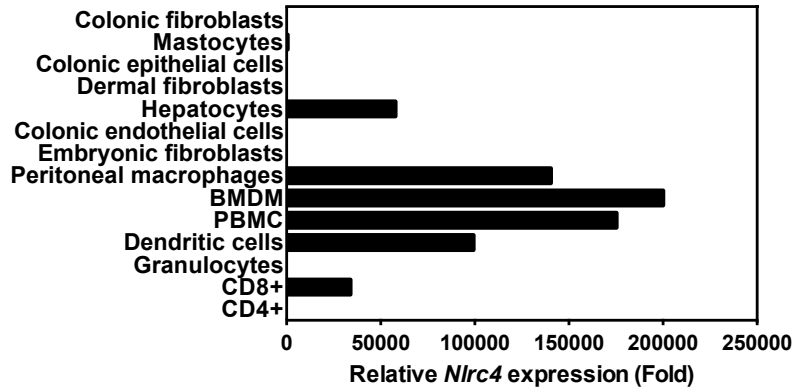
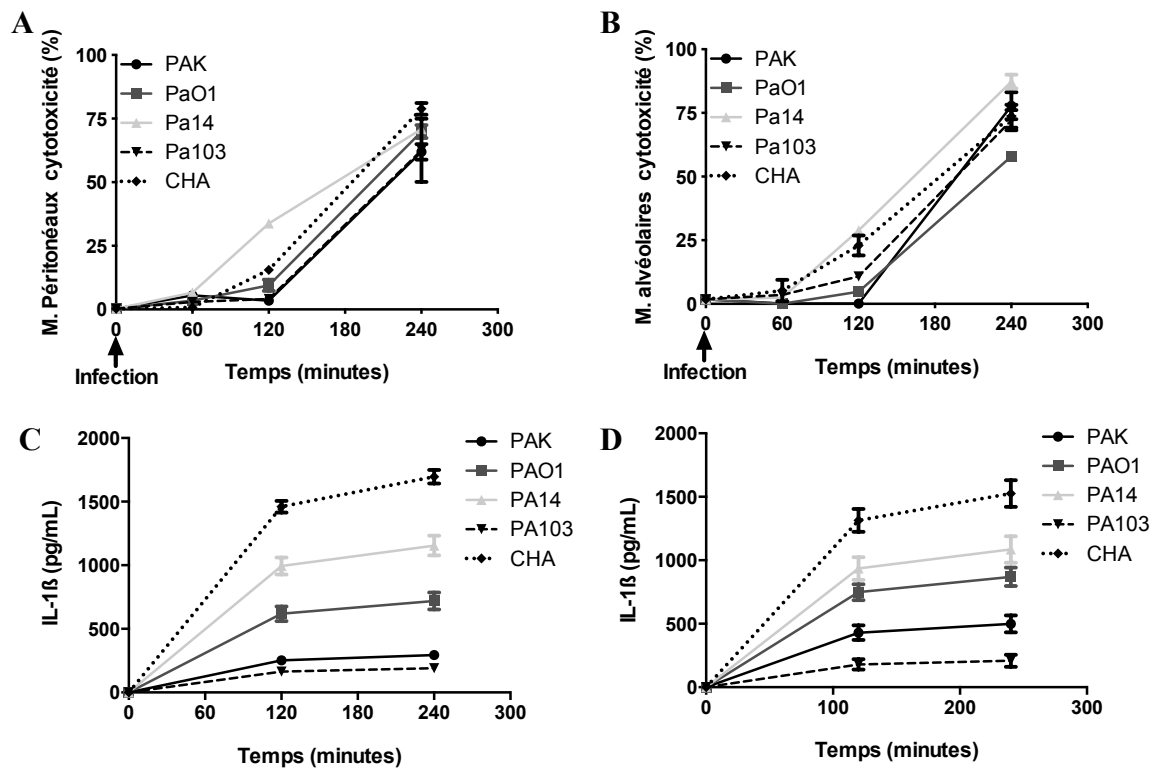


Figure 13 : Expression de NLRC4 dans différents types cellulaires

Les macrophages péritonéaux expriment NLRC4 (NLR family, card domain containing 4) (Figure 13). Ils sont facilement accessibles et obtenus en grand nombre comparés aux macrophages alvéolaires. De plus, les profils de cytotoxicité et de sécrétion des cytokines dépendantes de l'inflammasome observés entre ces deux types de macrophages sont similaires (Figure 14A,B,C,D) . Ces macrophages péritonéaux ont donc été choisis pour modéliser *in vitro* l'infection.



**Figure 14 : Comparaison de la cytotoxicité et de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induites par différentes souches de *P. aeruginosa* sur les macrophages pulmonaires et péritonéaux**

A,B, Mesure de la cytotoxicité induite par le dosage des lactates déshydrogénases (LDH) dans les surnageants de macrophages infectés par méthode colorimétrique C,D Dosage de l'IL-1 $\beta$  dans les surnageants des macrophages Wt, *Nlrc4*<sup>-/-</sup> par méthode ELISA. D, A,B,C,D (n=4 par groupe, 50 000 cellules par puits MOI 20).

Les macrophages péritonéaux sont infectés pendant 4 heures avec les différentes souches de *P. aeruginosa*. L'analyse du relargage de lactate déshydrogénase (LDH) dans les surnageants, témoin de la cytotoxicité, permet d'identifier des profils de cytotoxicité différents selon les souches (Figure 14A). En effet, les souches les plus cytotoxiques sont la souche PA14, flagellée et possédant l'exotoxine Exo U ainsi que la souche CHA (Figure 14A). Les souches les moins cytotoxiques étant PAO1 et PA103 (Figure 14A). Enfin, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  est la plus importante chez la souche CHA et la souche PA14 (Figure 14C, 14D). Les profils de sécrétion montrant une phase de sécrétion d'IL-1 $\beta$  importante et une faible cytolyse dans les deux premières heures suivant l'infection, l'analyse au temps 2 heures a donc été choisie pour l'analyse de l'activation de l'inflammasome lors des expériences ultérieures. Cette analyse précoce permet de s'affranchir d'un relargage massif d'IL-1 $\beta$  dans les surnageants lié non pas à une sécrétion active, mais à une mort cellulaire à membrane rompue. La souche CHA induit

la plus forte sécrétion d'IL-1 $\beta$ , celle-ci a donc été choisie pour les expériences ultérieures afin d'évaluer au mieux l'activation de l'inflammasome.

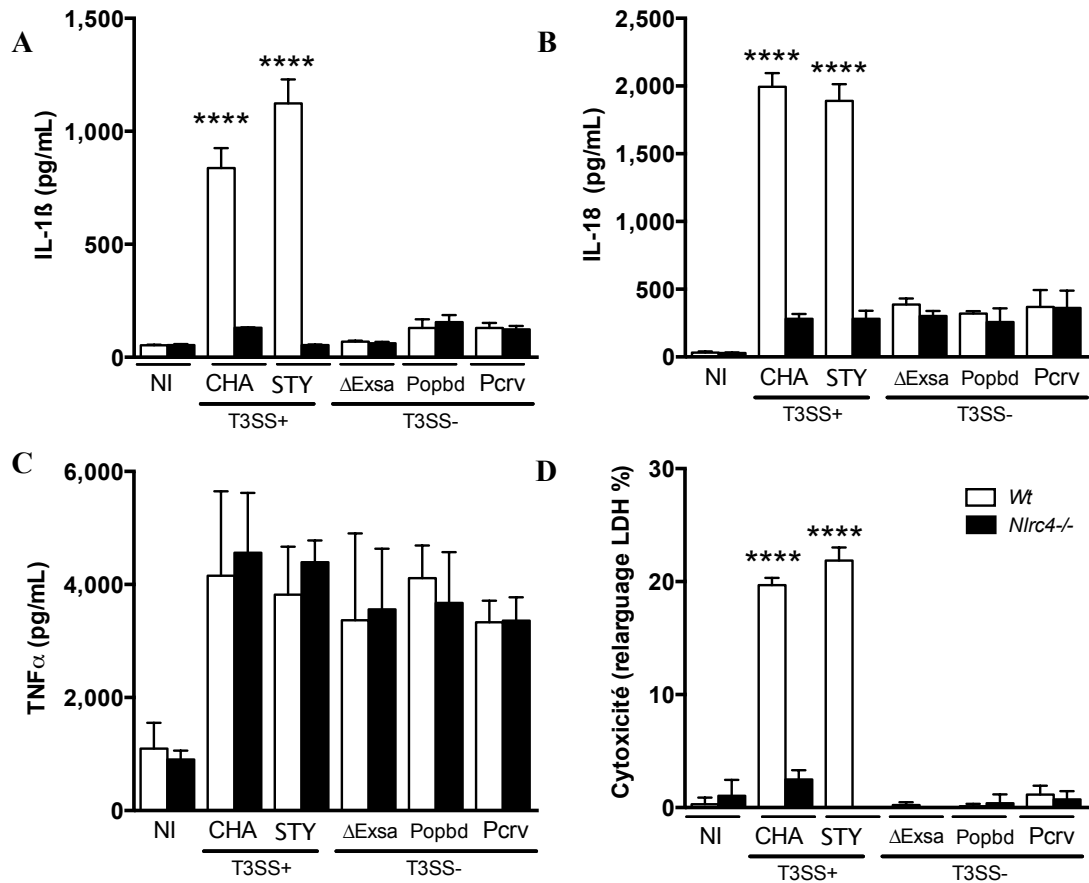
## 2) Choix du Nod-like récepteurs (NLR) d'intérêt

### a. *In-vitro*

Comme nous l'avons vu précédemment, l'inflammasome peut être activé par de nombreux NLRs dont les motifs de reconnaissances et les voies d'activation varient. Parmi les nombreux NLRs, NLRC4 a été démontré comme interagissant avec NAIP5 permettant l'activation de l'inflammasome en réponse à la protéine FliC du flagelle de *P. aeruginosa*. Plus récemment, le SST3 a été identifié comme un activateur potentiel de NLRC4. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons infecté des macrophages péritonéaux issus de souris C57BL/6 wild-type (*Wt*) et de souris déficientes pour NLRC4 (*Nlrc4*<sup>-/-</sup>) de même fond génétique, avec la souche CHA, précédemment choisie et différentes souches mutées pour le SST3 de CHA: La souche CHA $\Delta$ STY, possédant un SST3 fonctionnel mais ne pouvant sécréter d'exotoxines, les souches CHA $\Delta$ popBD, CHA $\Delta$ PcrV, possédant un SST3 non fonctionnel et enfin la souche CHA $\Delta$ Exsa, ne possédant pas de SST3 (Tableau 12).

	Fonctionnel (T3SS+)		Non Fonctionnel (T3SS-)		
	CHA	CHA $\Delta$ STY	CHA $\Delta$ Exsa	CHA $\Delta$ popBD	CHA $\Delta$ PcrV
Exotoxines	+	-	+	+	+
SST3	+	+	-	+	+

Tableau 12 : Caractéristiques du SST3 des souches mutantes de CHA



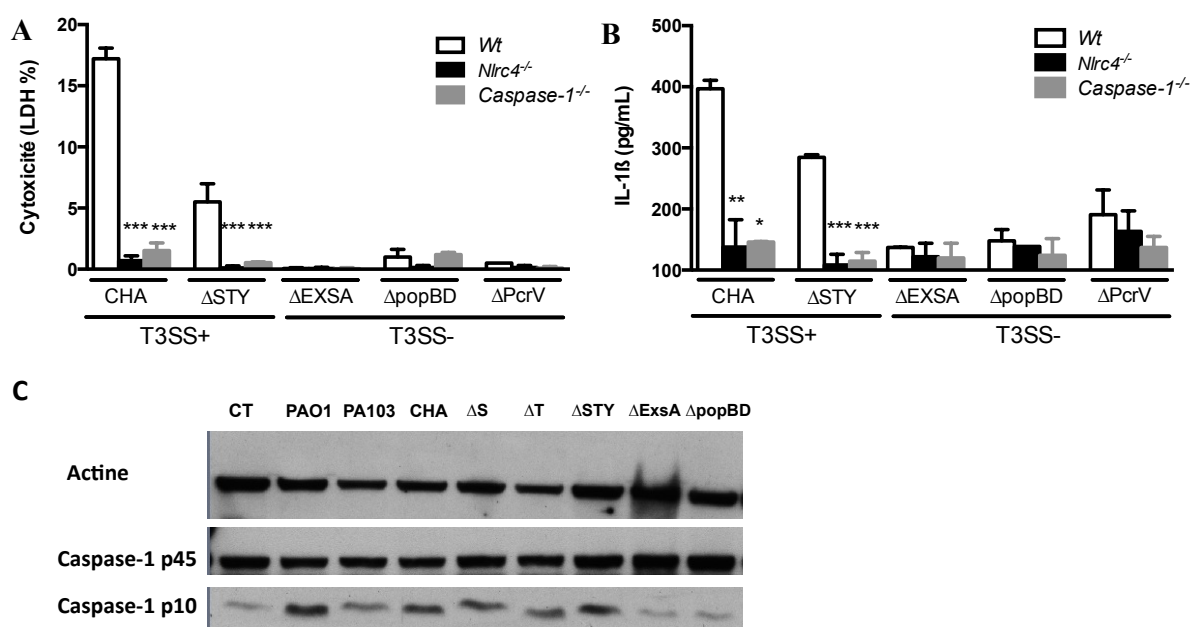
**Figure 15 : Implication de la reconnaissance d'un SST3 fonctionnel par NLRC4.** A,B,C Dosage de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18 et le TNF $\alpha$  dans les surnageants des macrophages *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> par méthode ELISA. D, mesure de la cytotoxicité induite par le dosage des lactates deshydrogénases (LDH) dans les surnageants de macrophages infectés par méthode colorimétrique A,B,C,D (n=4 par groupe, 50 000 cellules par puit MOI 20). \*\*\*\*p<0,0001 par une ANOVA à mesures répétées. La barre d'erreur représente l'écart-type.

Les analyses ont été réalisées 2 heures après l'infection. Ainsi nous observons une sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18, les cytokines dépendantes de l'activation de l'inflammasome, dans les surnageants des macrophages *Wt* infectés par les souches ayant un SST3 fonctionnel, indépendamment de la sécrétion d'exotoxines, (souches CHA et CHA $\Delta$ STY) (Figure 15A et 15B). Les souches n'ayant pas de SST3 (CHA $\Delta$ Exsa) ou un SST3 non fonctionnel (CHA $\Delta$ popBD et CHA $\Delta$ PcrV), ne permettent pas d'induire de sécrétion d'IL-1 $\beta$  ni d'IL-18 (Figure 15A et 15B), suggérant un rôle du SST3 dans l'activation d'un inflammasome. A l'instar des macrophages *Wt*, aucune sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 n'était par ailleurs observée dans les surnageants des macrophages *Nlrc4*<sup>-/-</sup> infectés avec les souches déficientes pour le SST3 (Figure 15A et 15B). De plus, lorsque les macrophages *Nlrc4*<sup>-/-</sup> étaient infectés avec une souche ayant un SST3 fonctionnel (T3SS+), la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 était significativement diminuée par rapport aux macrophages *Wt* (Figure 15A et 15B), suggérant



bien un rôle du NLRC4-inflammasome, spécifiquement, dans la reconnaissance du SST3 de *P. aeruginosa*. Le TNF $\alpha$  est une cytokine majeure de la réponse de l'hôte, indépendante de l'inflammasome, mais corrélée avec la charge bactérienne. Cette cytokine a donc été choisie comme contrôle pour la sécrétion de cytokines. Aucune différence n'a été observée dans les surnageants de macrophages *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> et ce indépendamment de la souche utilisée (Figure 15C).

L'analyse de la mort cellulaire par le relargage de LDH montre que les souches déficientes pour le SST3 (T3SS-) induisent peu de morts cellulaires, conformément aux données de la littérature et non significativement différentes entre les macrophages *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup>. Par contre, la mort cellulaire induite par les souches T3SS+ est significativement plus élevée sur les macrophages *Wt* que sur les macrophages *Nlrc4*<sup>-/-</sup> suggérant l'implication d'une mort cellulaire dépendante de l'activation de NLRC4. (Figure 15D).

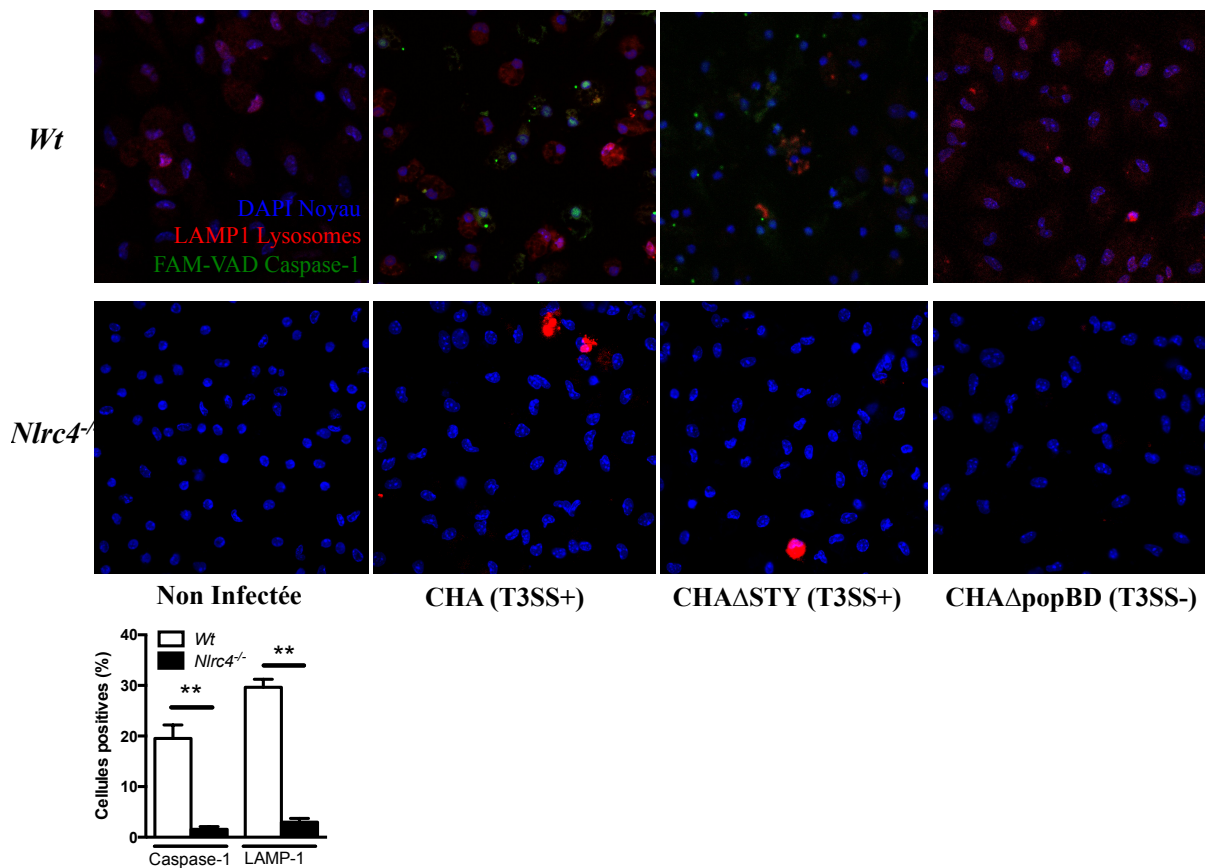


**Figure 16 : Le SST3 de la souche CHA active le NLRC4-inflammasome.**

A. Mesure de la cytotoxicité induite par le dosage des lactates deshydrogénases (LDH) dans les surnageants de macrophages infectés par méthode colorimétrique B, Dosage de l'IL-1 $\beta$  dans les surnageants des macrophages *Wt*, *Nlrc4*<sup>-/-</sup> et *Caspase-1*<sup>-/-</sup> par méthode ELISA. C, Western-Blot Pro-caspase-1 (p45) et caspase-1 activée (p10) après infection de macrophages THP-1 par différentes souches mutantes de CHA, réalisé par Ahalieyah Anantharajah, UCL, Belgique). A,B (n=4 par groupe, 50 000 cellules par puit MOI 20) \*\*\*p<0,001 \*\* p<0,01 \*p<0,05 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

L'expérience précédente montrant l'implication de NLRC4 dans la reconnaissance de *P. aeruginosa*, nous avons réinfecté des macrophages péritonéaux issus de souris *Wt*, *Nlrc4*<sup>-/-</sup> et

*Caspase-1*<sup>-/-</sup> pour affirmer l'implication de l'inflammasome (caspase-1) dans la mort cellulaire (Figure 15D), et la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , d'IL-18 (Figure 15A et 15B). Nous confirmons ainsi les résultats obtenus lors de l'expérience précédente (Figure 16A et 16B). Enfin nous observons les mêmes profils entre les macrophages *Nlrc4*<sup>-/-</sup> et *Caspase-1*<sup>-/-</sup> (Figure 16A et 16B) affirmant bien le rôle du NLRC4-inflammasome dans la reconnaissance du SST3 *P. aeruginosa*, indépendamment des exotoxines. L'ELISA ne permet pas de différencier la pro-IL-1 $\beta$ , issue de l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B, et l'IL-1 $\beta$  mature, issue du clivage de la pro-IL-1 $\beta$  par une caspase-1 activée, témoin de l'activation d'un inflammasome. Pour démontrer l'activation de l'inflammasome nous avons réalisé un Western-Blot à la recherche du fragment p10 de la caspase-1, correspondant à la caspase-1 activée après infection avec les différentes souches mutantes de CHA ainsi que les souches préalablement testées précédemment (Figure 16C). Nous confirmons que l'activation du NLRC4-inflammasome est significativement réduite en l'absence d'un T3SS fonctionnel et indépendamment des exotoxines (Figure 16C).

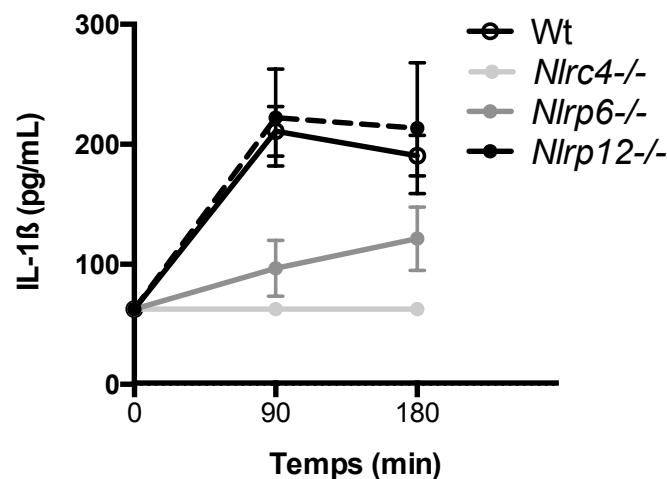


**Figure 17 : Le SST3 induit la mort cellulaire pyroptotique des macrophages**

(2 expériences successives, n=4 par groupe, 50 000 cellules par puits, MOI 10). Marquage des noyaux par le DAPI (bleu), de

la caspase-1 par le FAM-FLICA (vert) et de LAMP-1 (rouge). Graphique représentant les cellules infectées par la souche CHA (T3SS+). \*\* p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart-type.

L'activation de l'inflammasome permet la sécrétion de cytokines sous forme mature mais conduit à une mort cellulaire pro-inflammatoire spécifique appelée pyroptose. Le dosage du relargage de LDH dans les surnageants ne permet pas de différencier le type de mort cellulaire impliquée. Nous avons donc infecté les macrophages péritonéaux *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> avec les mêmes souches et regardé en microscopie confocale si les signaux connus pour étudier la pyroptose étaient présents, indiquant que la différence de mort cellulaire observée (Figure 15D et 16A) est bien due à l'activation de l'inflammasome. Les macrophages ont été marqués au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI, Bleu), au FAM-FLICA (caspase-1, vert) ainsi qu'avec un anticorps anti-LAMP1 (Rouge). La présence conjointe du signal de LAMP1 et de la caspase-1 dans le cytoplasme témoigne d'une mort cellulaire médiée par la caspase-1 (pyroptose). Ces deux signaux sont observés lors de l'infection des macrophages *Wt* avec les souches T3SS+ et absents avec les souches T3SS- (Figure 17A). Par ailleurs, ces deux signaux ne sont pas retrouvés dans les macrophages *Nlrc4*<sup>-/-</sup> (Figure 17A), suggérant l'implication de la pyroptose dans la différence de morts cellulaires précédemment observée (Figure 15D, 16A). Cette expérience ayant été reproduite deux fois, nous retrouvons une augmentation significative du signal de LAMP-1 et de la caspase-1 chez les macrophages *Wt* par rapport aux macrophages *Nlrc4*<sup>-/-</sup> (Figure 17B) en cumulant les observations des deux expériences successives.



**Figure 18 : Implication de NLRP6 et NLRP12 dans la reconnaissance de *P. aeruginosa***

Dosage de l'IL-1β dans les surnageants des macrophages *Wt*, *Nlrc4*<sup>-/-</sup>, *Nlrp6*<sup>-/-</sup> et *Nlrp12*<sup>-/-</sup> par méthode ELISA (n=5 par point, 50 000 cellules par puit, souche CHA MOI 20)

Dans une dernière expérience, et afin de ne pas méconnaître d'autres NLR d'intérêt, nous avons infecté avec la souche CHA (T3SS+) des macrophages *Wt*, *Nlrc4<sup>-/-</sup>*, ainsi que des macrophages *Nlrp6<sup>-/-</sup>* et *Nlrp12<sup>-/-</sup>*, deux NLR identifiés récemment et pour lesquels peu de données existent. Nous avons observé le relargage d'IL-1 $\beta$  dans les surnageants comme témoin d'activation de l'inflammasome. Les taux d'IL-1 $\beta$  n'étaient pas significativement différents entre les macrophages *Nlrp12<sup>-/-</sup>* et *Wt*, suggérant l'absence de rôle de NLRP12 dans la reconnaissance de *P. aeruginosa* (Figure 18), par contre, les taux d'IL-1 $\beta$  dans les surnageants des macrophages *Nlrp6<sup>-/-</sup>* étaient significativement diminués suggérant un rôle possible du NLRP6-inflammasome (Figure 18).

### b. In-vivo

Pour tester la pertinence de nos résultats obtenus *in-vitro*, nous avons réalisé une expérience de survie à 96 heures après l'induction d'une pneumonie aiguë avec la souche CHA chez des souris *Wt*, *Nlrc4<sup>-/-</sup>*, *Nlrp6<sup>-/-</sup>* et *Nlrp12<sup>-/-</sup>*.

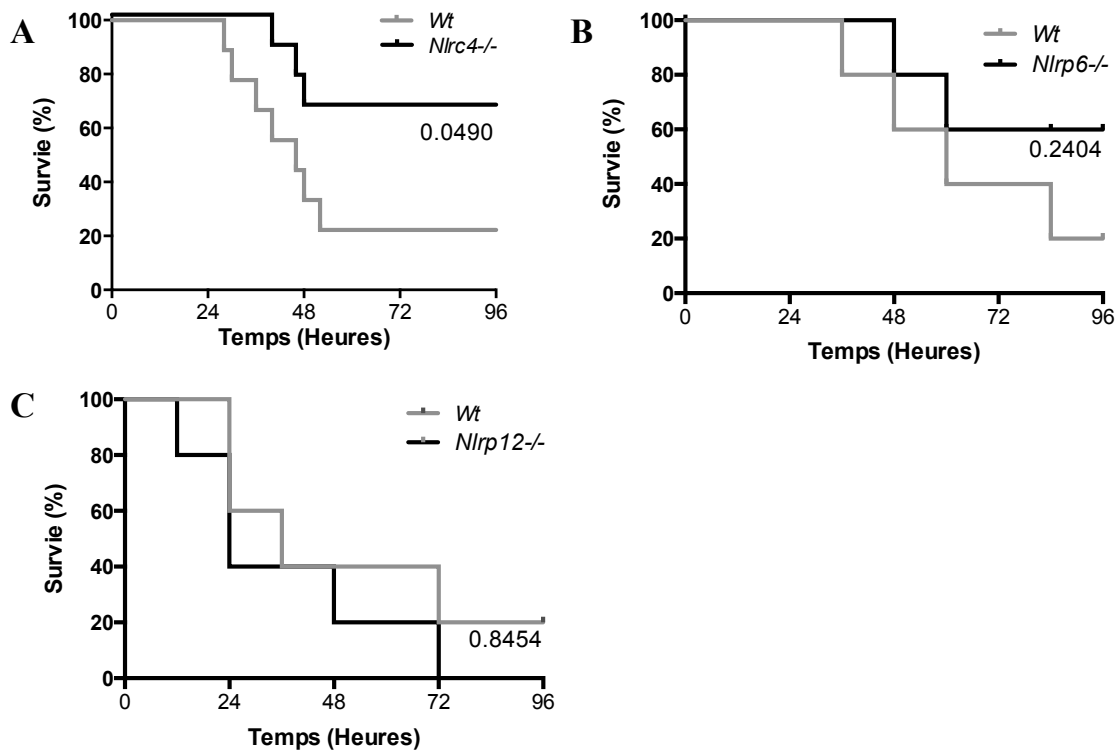
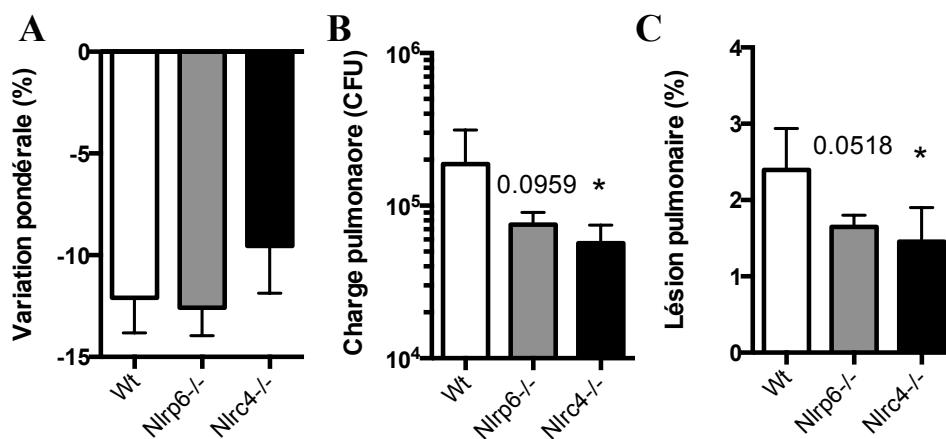


Figure 19 : Intérêt de la reconnaissance de *P. aeruginosa* T3SS+ (souche CHA) par NLRC4, NLRP6 et NLRP12 dans un modèle de survie à 96 heures

A,B,C Les souris sont infectées par voie intra-nasale avec  $1.10^7$  UFC de la souche CHA. A, n=9 par groupe. B,C n=5 par groupe. Analyse statistique réalisée par un test de log-rank. Une valeur  $<0,05$  est considérée comme significative.

De façon surprenante, la survie des souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> était significativement augmentée par rapport aux souris *Wt* (Figure 19A). Aucune différence significative n'était observée pour les souris *Nlrp6*<sup>-/-</sup> et *Nlrp12*<sup>-/-</sup> comparées aux *Wt* (Figure 19B et 19C), bien que 2 souris *Nlrp6*<sup>-/-</sup> aient survécu à 96 heures (Figure 19B).



**Figure 20 : Évaluation de la reconnaissance de *P. aeruginosa* (souche CHA) par NLRC4 et NLRP6 dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë**

A, Variation pondérale calculée par le pourcentage de perte de poids par rapport au poids initial. B, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. C, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. A,B,C (n=5 par groupe) \*p<0,05 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

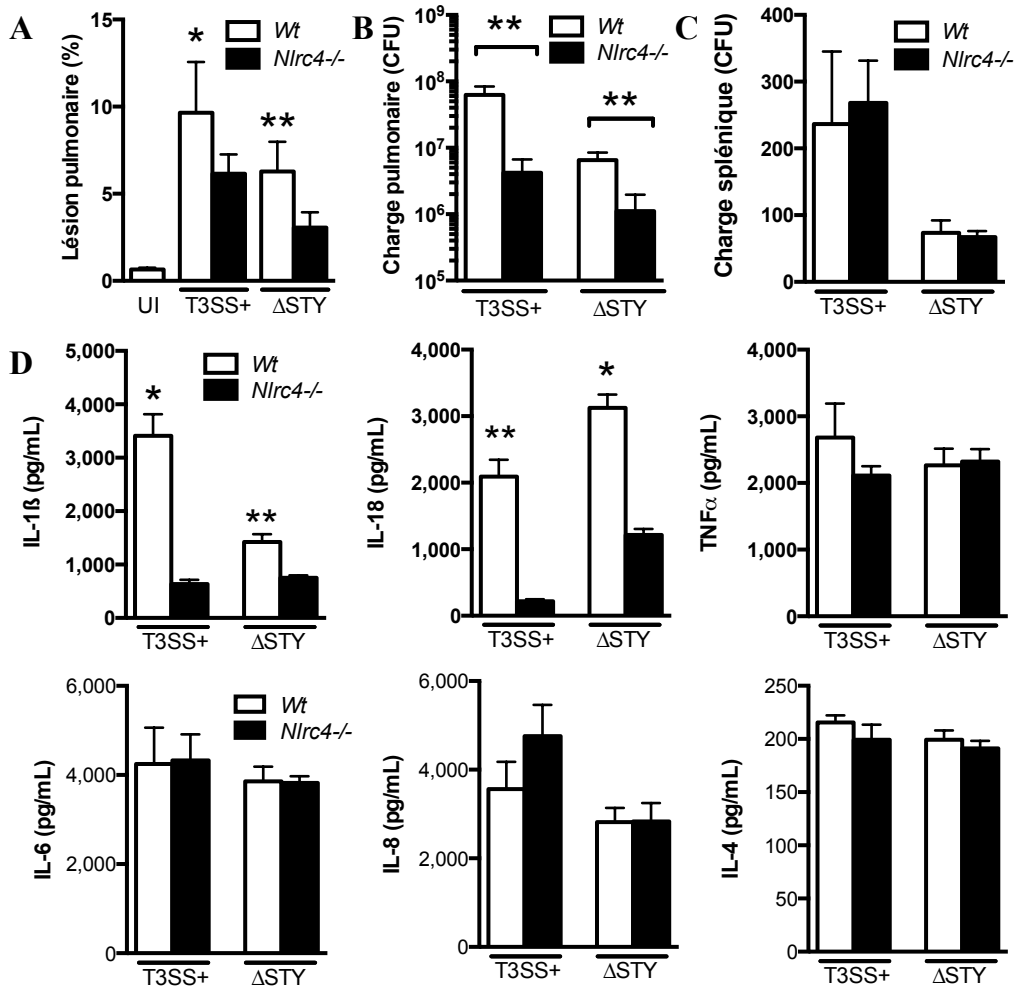
Dans un second temps, nous avons réalisé un modèle d'agression pulmonaire aiguë avec la souche CHA à 24 heures comparant des souris *Wt*, *Nlrc4*<sup>-/-</sup>, *Nlrp6*<sup>-/-</sup>. La perte de poids avait significativement diminuée (Figure 20A), la clairance bactérienne pulmonaire était augmentée (Figure 20B) et la lésion pulmonaire était diminuée (Figure 20C) chez les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> comparées aux *Wt*. Ces trois observations peuvent expliquer l'augmentation de la survie observée à 96 heures (Figure 20A). Les mêmes résultats étaient observées chez les souris *Nlrp6*<sup>-/-</sup> mais de façon non significative (figure 20B et 20C).

Au vu de ces résultats, nous avons décidé d'explorer l'implication du NLRC4-inflammasome dans la réponse immunitaire innée de l'hôte dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë avec la souche CHA.

## **Chapitre 2 : L'activation du NLRC4-inflammasome par le SST3 inhibe les défenses antibactériennes de l'hôte**

### **1) Effet délétère de l'activation du NLRC4-inflammasome par le SST3 de *P. aeruginosa*, indépendamment des exotoxines.**

Dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë, les souris ont été infectées avec la souche CHA et la souche CHA $\Delta$ STY. Nous avons exploré la réponse de l'hôte en réalisant le dosage de cytokines dans le surnageant des lavages bronchoalvéolaires (LBA) à la 24<sup>e</sup> heure.



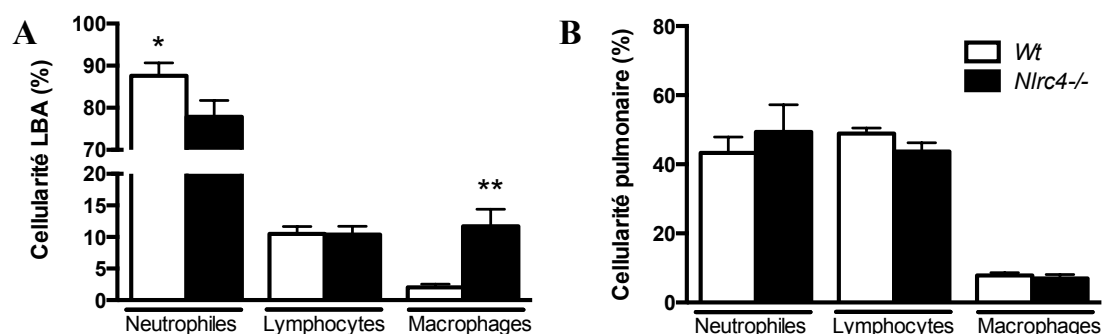
**Figure 21 : Analyse de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë comparant des souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> infectées avec la souche CHA (T3SS+) et CHAΔSTY (ΔSTY)**

A,B,C, Analyse des souris infectées avec la souche CHA (T3SS+) ou CHAΔSTY (ΔSTY). A, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. B, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. C, Charge splénique en UFC estimée par étalement et dilution d'homogénats de rate. C, Dosage de l'IL-1β, l'IL-18, TNFα, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-4 dans les surnageants des LBA des souris *Wt*, *Nlrc4*<sup>-/-</sup> par méthode ELISA A,B,C (n=5 par groupe) \*p<0,05 \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart-type.

Nous confirmons ainsi les données précédentes, en effet nous observons toujours une diminution de la lésion pulmonaire (Figure 21A) ainsi qu'une augmentation de la clairance bactérienne (Figure 21B) chez les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup>, indépendamment des exotoxines, les résultats obtenus avec la souche CHAΔSTY étant superposables à ceux obtenus avec la souche CHA (Figure 21A et 21B). La dissémination bactérienne secondaire, évaluée par la charge bactérienne splénique, n'était pas différente entre les 2 génotypes, témoignant d'un phénomène local pulmonaire, plutôt que d'un phénomène systémique du à une différence d'invasivité et de dissémination (Figure 21C)

L'analyse de la réponse cytokinique montre une diminution significative de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 dans les surnageants des LBA des souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup>, indépendamment de la présence des exotoxines du SST3 (Figure 21D), témoignant du rôle essentiel de NLRC4 dans l'activation de l'inflammasome en réponse à *P. aeruginosa*. Aucune différence n'a été retrouvée dans les surnageants des souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> pour le TNF $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-8 (Figure 21D), dépendante de l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B, suggérant l'implication spécifique de l'inflammasome dans ce phénotype. Enfin, aucune différence n'a été retrouvée pour l'IL-4 (Figure 21D).

Nous avons ensuite analysé les formules cellulaires dans les LBA ainsi que dans les poumons totaux en réponse à l'infection à *P. aeruginosa* par méthode de cytométrie en flux.



**Figure 22 : Formule des LBA et des cellules pulmonaires totales par Cytométrie en flux**

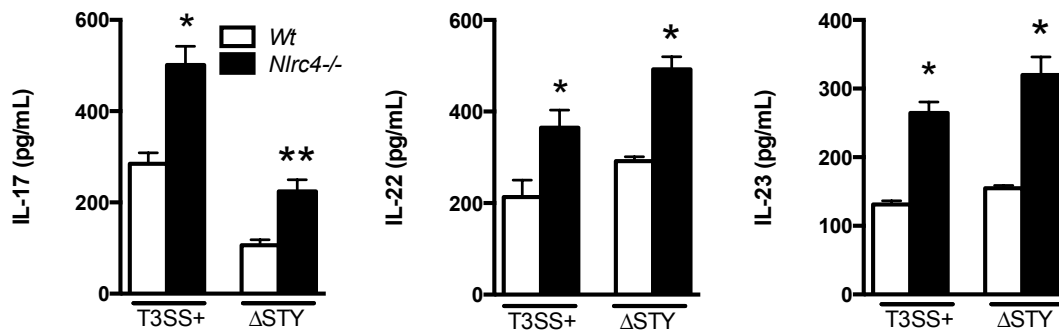
A, B, Formules réalisées respectivement dans les LBA et les poumons totaux des souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> exprimées en pourcentage de la cellularité totale pour les trois principaux types cellulaires dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë avec la souche CHA à la 24<sup>e</sup> heure. Neutrophiles : CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, Lymphocytes : CD45<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> ou CD3<sup>+</sup>, Macrophages : CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>. (n=5 par groupe) \*p<0,05 \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart-type.

Nous retrouvons ainsi une augmentation des macrophages et une diminution des neutrophiles dans la formule des LBA des souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> en comparaison avec les souris *Wt* (Figure 22A). Ces différences pouvant être expliquées par la diminution de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 chez les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> réduisant le recrutement des polynucléaires neutrophiles. L'augmentation des macrophages ne semblant pas liée aux chimiokines attractantes ne variant pas significativement entre les phénotypes (JE, MCP-1, CCL20, résultats non montrés), celle-ci pourrait être attribuée à la diminution de la pyroptose observée *in-vitro* (Figure 15D et 16A).



Aucune différence n'a été retrouvée dans les formules des cellules pulmonaires totales (Figure 22B).

## 2) La voie Th17 est activée chez les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup>

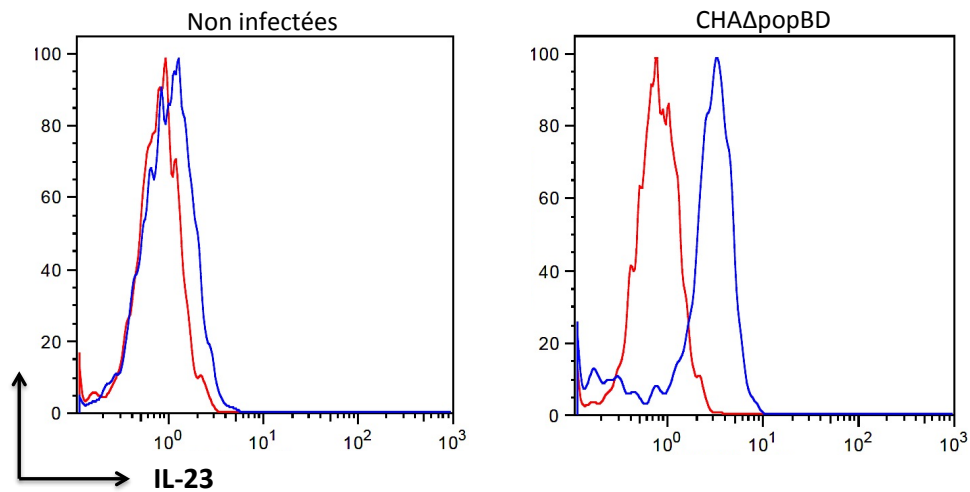


**Figure 23 : La réponse immune innée pulmonaire des souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> implique l'IL-17A et l'IL-22**

Dosage de l'IL-17A, l'IL-22 et l'IL-23 dans les surnageants des LBA des souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> infectées avec la souche CHA (T3SS+) ou CHAΔSTY (ΔSTY) par méthode ELISA (n=5 par groupe) \*p<0,05 \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart-type.

L'analyse des autres cytokines dans les surnageants de LBA montre une augmentation de l'IL-23, l'IL-17A et l'IL-22 (Figure 23) dans les surnageants des souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> comparées aux souris *Wt*. L'IL-23 est sécrétée par les cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires et permet d'orienter la réponse immune vers une voie Th17 précoce, antigène-indépendante, conduisant à la sécrétion d'IL-17A par des cellules immunitaires professionnelles variées. La présence de cette voie Th17 associée à une diminution des cytokines dépendantes de la caspase-1 (figure 21D) est la seule différence de réponse immune innée observée entre les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> et les souris *Wt*.

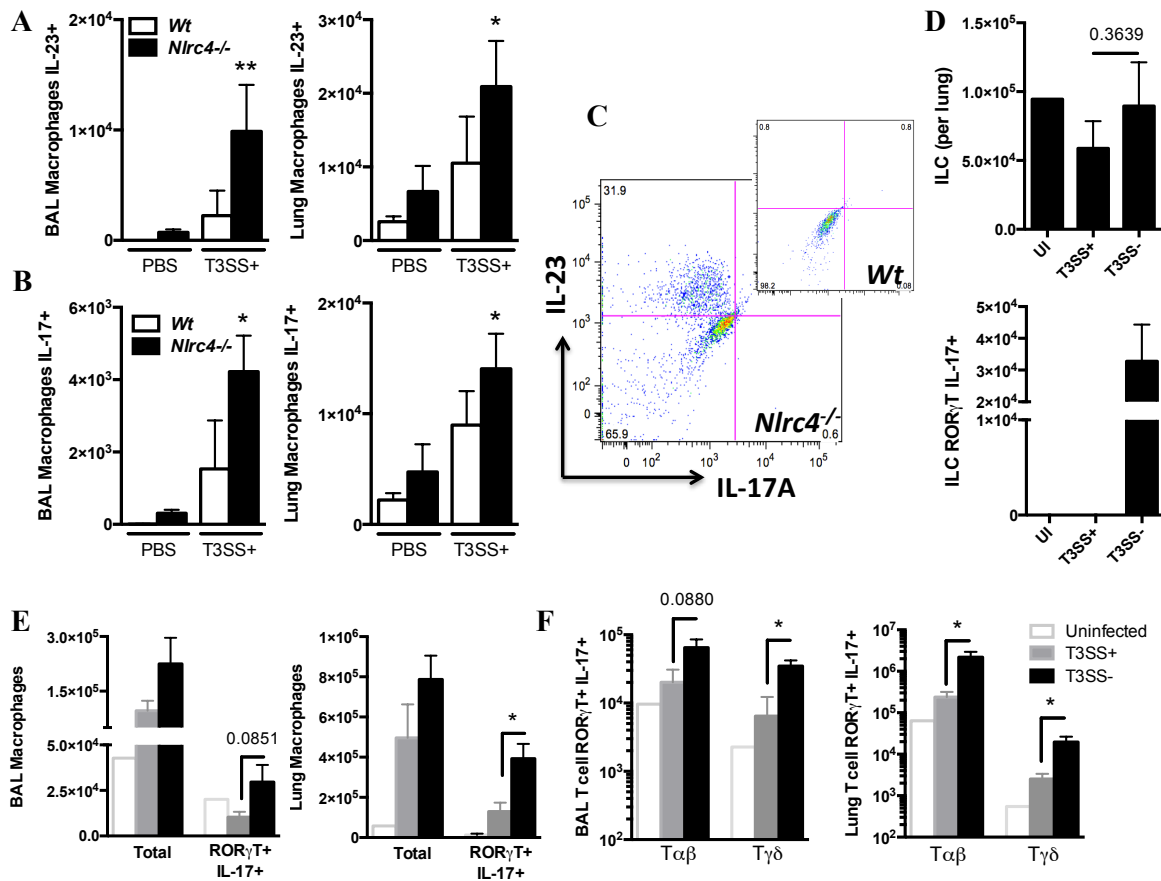
Afin d'identifier les cellules impliquées dans la sécrétion d'IL-23 et d'IL-17A, nous avons réalisé une analyse par cytométrie en flux avec un marquage intracellulaire IL-23 et IL-17 des cellules issues du LBA ainsi que des cellules pulmonaires totales des souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> infectées avec la souche CHA ou ayant reçu du PBS comme contrôle. L'IL-23 est constituée de deux sous-unités, une sous-unité spécifique p19 et une sous-unité p40 commune avec l'IL-12. Nous avons au préalable testé la spécificité de notre marquage sur des macrophages dérivés de la moëlle (BMDM) provenant de souris *IL-23p19*<sup>-/-</sup> (Figure 24, en rouge) et de souris *Wt* (Figure 24, bleu) après une infection avec la souche CHAΔpopBD (T3SS-).



**Figure 24 : Spécificité du marquage intracellulaire de l'IL-23 en cytométrie en flux**

Des BMDM issues de souris *Wt* (bleu) et *IL-23p19<sup>-/-</sup>* (rouge) ont été infectées (300 000 par puit) pendant 5 heures par la souche CHAΔpopBD (MOI 10) et marquées avec le CD45. Les cellules ont été perméabilisées et traitées à la brefeldine puis marquées en intracellulaire avec un anticorps anti-IL-23.

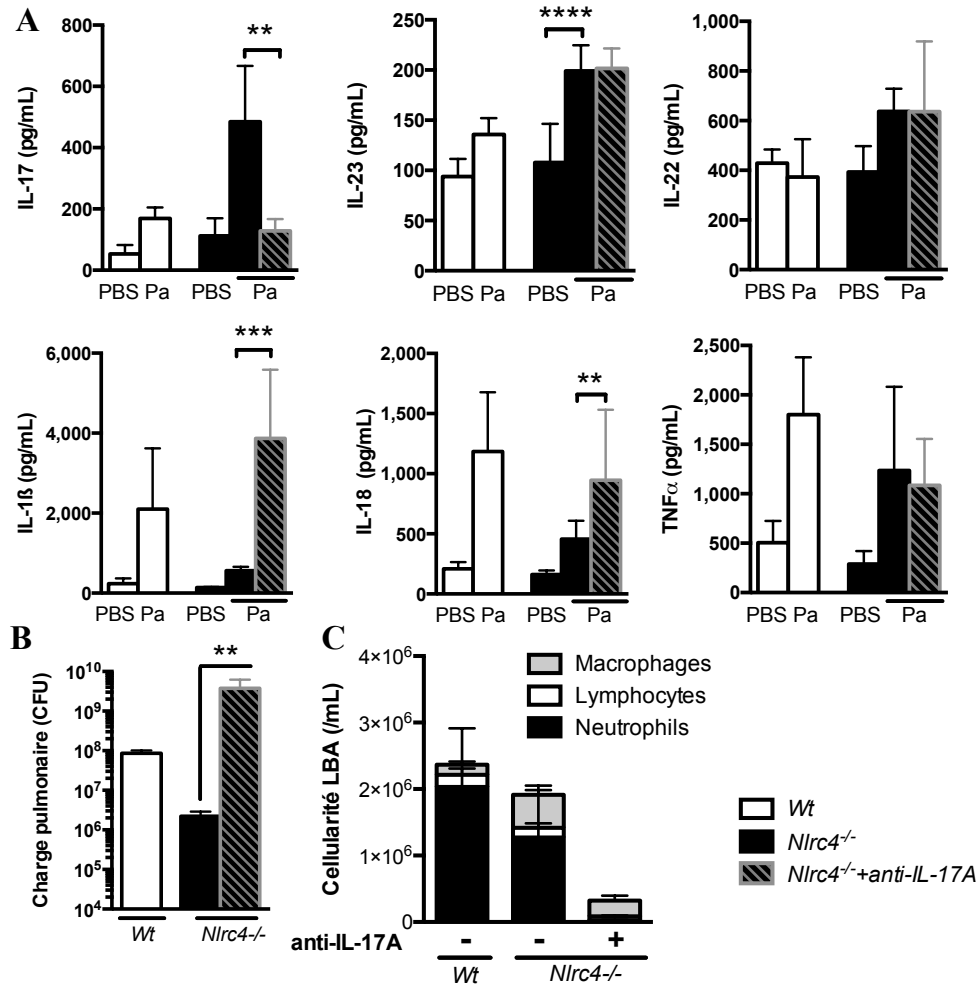
Nous observons une positivité du marquage intracellulaire à l'IL-23 dans les BMDM de souris *Wt* après l'infection alors qu'aucun marquage n'est observé dans les macrophages de souris *IL-23p19<sup>-/-</sup>* (rouge) (Figure 24). L'analyse des différentes populations montre que les cellules principalement impliquées dans la sécrétion d'IL-23 et d'IL-17 sont les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> pulmonaires et alvéolaires, les macrophages alvéolaires et pulmonaires et enfin les innate lymphoid cells (ILCs) (Figure 25A, 25B et 25C).



**Figure 25 : Analyse par cytométrie en flux des cellules productrices d'IL-17A/ROR $\gamma$ T et d'IL-23 dans les LBA et les cellules pulmonaires totales des souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë.** A,B,C Analyse des cellules des LBA et des cellules pulmonaires totales des souris non infectées (PBS) ou infectées avec la souche CHA (T3SS+) A, Analyse des macrophages pulmonaires et alvéolaires (CD45+, CD11c+, F4/80+) marqués en intracellulaire par un anticorps anti-IL-17A (A,C) et anti-IL-23 (B,C). D,E,F Analyse des LBA et des cellules pulmonaires totales des souris ROR $\gamma$ T-GFP infectées avec les souches T3SS+ et T3SS-. D, Analyse des ILCs (CD45+, lin-, CD4-, CD127+, CD90.2+) marqués en intracellulaire par un anticorps anti-IL-17A et ROR $\gamma$ T positives. E, Analyse des macrophages (CD45+, CD11c+ F4/80+) marqués en intracellulaire par un anticorps anti-IL-17A et ROR $\gamma$ T positives F, Analyse des sous types de cellules T (CD45+, TCR+,  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ ) marqués en intracellulaire par un anticorps anti-IL-17A ROR $\gamma$ T positives. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  par t-test, la barre d'erreur représente l'écart-type.

### 3) La réponse Th17 conduit à l'expression de peptides antimicrobiens

Afin de connaître l'impact de cette réponse Th17 précoce sur la clairance bactérienne observée chez les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup>, nous avons infecté les souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> avec la souche CHA. Chaque génotype était séparé en deux groupes : un groupe traité avec un anticorps anti-IL-17A toutes les 12 heures par voie intra-péritonéale, un groupe contrôle traité avec du PBS selon les mêmes modalités. Toutes les souris *Wt* traitées avec l'anticorps anti-IL-17A sont mortes avant la 24<sup>e</sup> heure.



**Figure 26 : Impact de l'antagonisation de la voie Th17 par un anticorps anti-IL-17A dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë avec la souche CHA (T3SS+)**

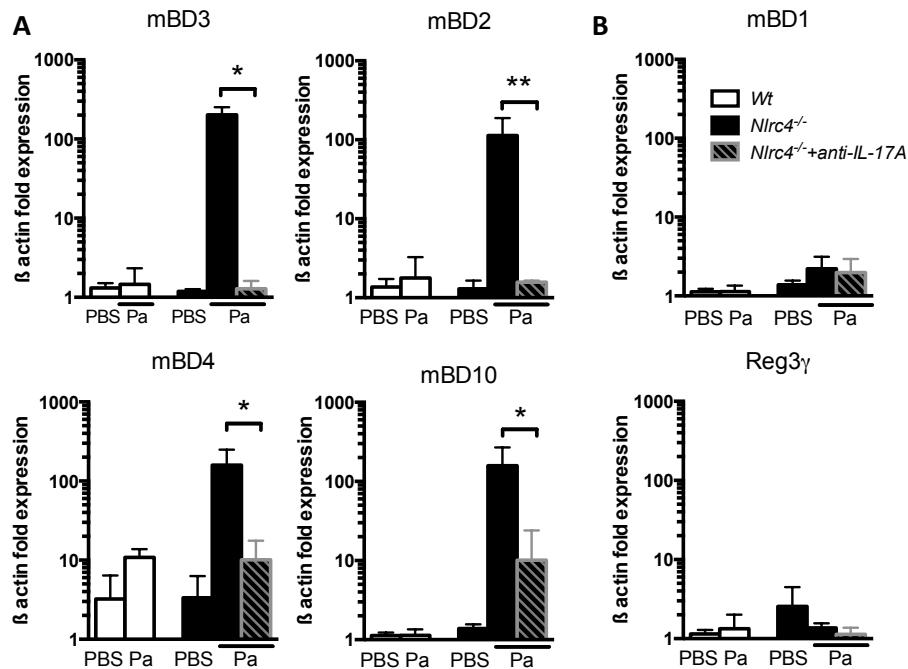
A,B,C, Analyse des souris *Wt* (blanc) et *Nlrc4<sup>-/-</sup>* (noir) non infectées (PBS) ou infectées avec la souche CHA, traitées (hachures) ou non avec un anticorps anti-IL-17A. A, Dosage de l'IL-17, l'IL-23, l'IL-22 l'IL-1β l'IL-18 et le TNFα dans les surnageants des LBA des souris *Wt*, *Nlrc4<sup>-/-</sup>* par méthode ELISA C, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. B, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. A,B,C (n=5 par groupe) \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

Comme nous l'attendions, le taux d'IL-17A dans les LBA des souris *Nlrc4<sup>-/-</sup>* traitées est significativement diminué par rapport aux souris non traitées (Figure 26A). Nous confirmons les résultats obtenus précédemment avec des taux d'IL-17A, d'IL-22 et d'IL-23 augmentés chez les souris *Nlrc4<sup>-/-</sup>* par rapport aux *Wt* (Figure 26A). Aucune différence pour les taux d'IL-23 et d'IL-22 n'est retrouvée (Figure 26A). Les cytokines dépendantes de l'inflammasome, IL-1β et IL-18 sont diminuées chez les souris *Nlrc4<sup>-/-</sup>* par rapport aux *Wt* (Figure 26A), mais de façon surprenante, les souris *Nlrc4<sup>-/-</sup>* traitées avec l'anticorps anti-IL-17A montrent une augmentation significative de l'IL-1β et de l'IL-18 par rapport aux souris

*Nlrp4*<sup>-/-</sup> non traitées (Figure 26A). Enfin, aucune différence n'est retrouvée pour les taux de TNF $\alpha$  (Figure 26A).

Nous retrouvons une augmentation de la clairance pulmonaire à 24 heures chez les souris *Nlrp4*<sup>-/-</sup> par rapport aux *Wt* (figure 26B), mais les souris *Nlrp4*<sup>-/-</sup> traitées avec l'anticorps anti-IL-17A montrent une diminution significative de la clairance bactérienne par rapport aux souris non traitées avec une augmentation de la charge bactérienne pulmonaire d'environ 3 log (Figure 26B). L'analyse de la cellularité des LBA fait apparaître un défaut de recrutement de polynucléaires neutrophiles chez les souris *Nlrp4*<sup>-/-</sup> traitées avec l'anticorps anti-IL-17A pouvant expliquer la diminution de la clairance bactérienne observée (Figure 26B). En effet à l'instar de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 sous leurs formes actives, l'IL-17 joue un rôle majeur dans le recrutement précoce des neutrophiles (Figure 26C).

Récemment, Liang *et al* ont montré que la sécrétion concomitante d'IL-17A et d'IL-22 conduisait à l'expression de peptides antimicrobiens par l'épithélium pulmonaire. Au regard des résultats obtenus précédemment et de la présence de cette réponse Th17 (IL-17A et IL-22) présente dans les BAL des souris *Nlrp4*<sup>-/-</sup>, nous avons donc mesuré l'expression des peptides antimicrobiens dans les cellules pulmonaires totales par méthode de PCR quantitative. Nous avons choisi de mesurer l'expression : de peptides antimicrobiens inductibles de l'épithélium pulmonaire appartenant à la famille des  $\beta$ -défensines murines (mBD-2, mBD-3, mBD-4 et mBD-10), ainsi que l'expression de deux autres peptides antimicrobiens non inductibles, servant de contrôle négatif : un de la même famille des murine  $\beta$ -défensines (mBD-1) et l'autre peu ou pas exprimé par l'épithélium pulmonaire Regy3.



**Figure 27 : Mesure de l'expression des peptides antimicrobiens pulmonaires par PCR quantitative**

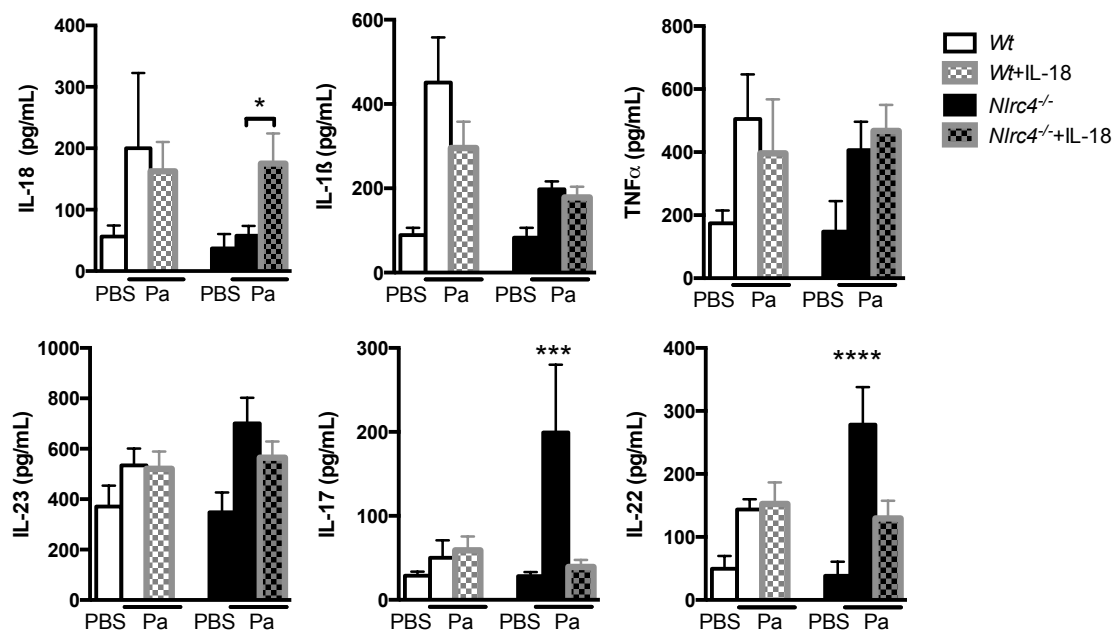
A,B Analyse des souris *Wt* (blanc) et *Nlrc4<sup>-/-</sup>* (noir) non infectées (PBS) ou infectées avec la souche CHA, traitées (hachures) ou non avec un anticorps anti-IL-17A. A, Expression des peptides antimicrobiens inductibles mBD-2, mBD-3, mBD-4 et mBD-10) dans les cellules pulmonaires totales rapportées à l'expression du gène de la  $\beta$ -actin (fold expression). B, Expression des peptides antimicrobiens constitutifs mBD-1, Reg3 $\gamma$  dans les cellules pulmonaires totales rapportées à l'expression du gène de la  $\beta$ -actin (fold expression). (n=5 par groupe) \*p<0,05 \*\*p<0,01 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

De façon superposable aux taux d'IL-17A et d'IL-22 dans les BAL (Figure 23A), nous retrouvons une augmentation significative de l'expression des peptides antimicrobiens inductibles chez les souris *Nlrc4<sup>-/-</sup>* comparées aux souris *Wt* (Figure 27A). Par contre, les souris *Nlrc4<sup>-/-</sup>* traitées avec l'anticorps anti-IL-17A, présentant des taux effondrés d'IL-17A (Figure 26A), montrent une expression significativement diminuée des peptides antimicrobiens inductibles (Figure 27A) parallèlement à une diminution significative de la clairance bactérienne pulmonaire (Figure 26B). Enfin aucune différence n'a été observée pour les peptides non inductibles, Reg3 $\gamma$  et mBD-1 (Figure 27B).

Finalement, la réponse Th17 présente chez les souris *Nlrc4<sup>-/-</sup>* participe au recrutement de polynucléaires neutrophiles et conduit à l'expression de peptides antimicrobiens permettant d'augmenter la clairance bactérienne.

#### 4) L'IL-18 réprime la réponse Th17

Au vu des résultats précédents nous avons voulu identifier le signal dépendant de l'inflammasome responsable de la répression de la réponse Th17 si bénéfique aux souris *Nlr4<sup>-/-</sup>*. Deux études réalisées sur des souris *IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup>* et *IL-1R<sup>-/-</sup>* (190) montrent une susceptibilité des souris à l'infection tandis qu'une autre étude montre que les souris *IL-18<sup>-/-</sup>* (131,190) survivent plus longtemps et présentent une clairance bactérienne pulmonaire augmentée. Aucune de ces études n'a mesuré les taux de l'IL-17A dans les surnageants des LBA. Nous avons donc décidé de traiter les souris *Nlr4<sup>-/-</sup>* avec de l'IL-18 recombinante murine par voie intra-péritonéale pour rétablir ce signal dépendant de l'inflammasome et observer l'impact sur la réponse de l'hôte dans notre modèle d'agression pulmonaire aiguë.

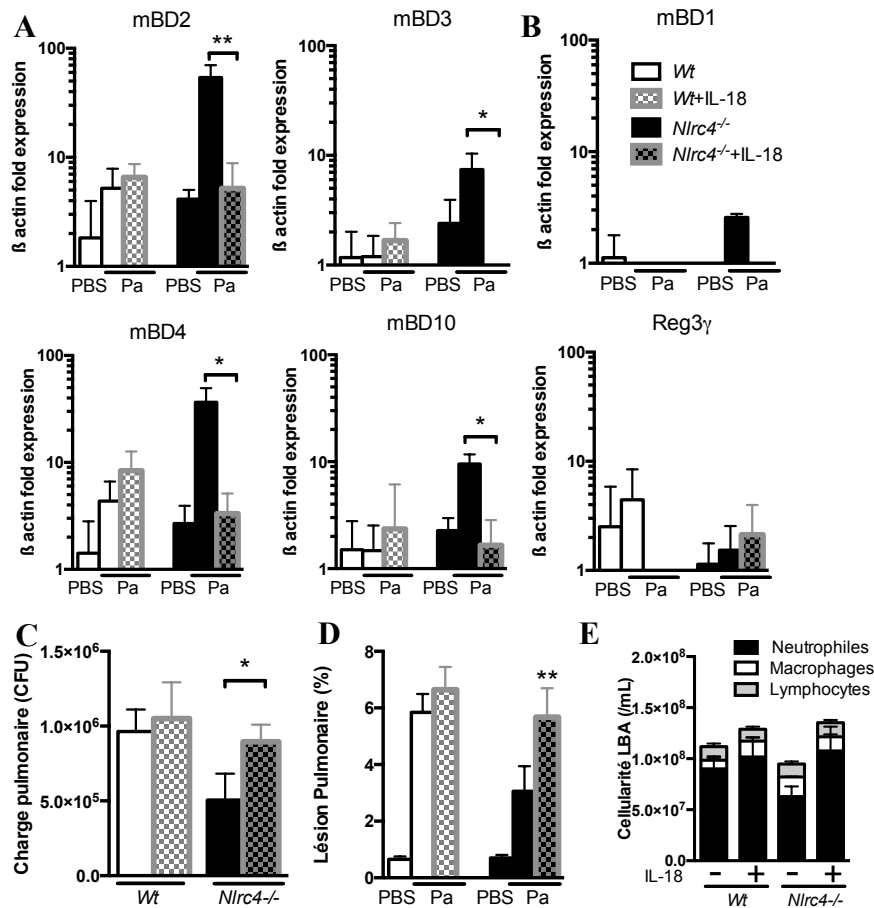


**Figure 28 : La sécrétion d'IL-18 par le NLR4-inflammasome réprime la sécrétion d'IL-17A**

Analyse des souris *Wt* (blanc) et *Nlr4<sup>-/-</sup>* (noir) non infectées (PBS) ou infectées avec la souche CHA (Pa) traitées (hachures) ou non avec de l'IL-18 recombinante murine. Dosage de l'IL-18, l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$ , l'IL-23, l'IL-17 et l'IL-22 dans les surnageants des LBA des souris *Wt*, et *Nlr4<sup>-/-</sup>* par méthode ELISA. (n=5 par groupe) \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

Le taux d'IL-18 dans les surnageants des LBA chez les souris *Nlr4<sup>-/-</sup>* traitées était comparable au taux présent dans les LBA des souris *Wt*. Par ailleurs, les souris *Wt* traitées montrent un taux d'IL-18 similaire à celui des souris non traitées (Figure 28). Aucune différence n'est constatée pour l'IL-1 $\beta$ , l'IL-23 et le TNF $\alpha$  entre les souris *Wt* et *Nlr4<sup>-/-</sup>*

traitées ou non traitées (Figure 28). Comme constaté auparavant, les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> présentent des taux d'IL-17A et d'IL-22 significativement plus élevés que les *Wt* (Figure 28). En revanche, les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> traitées avec l'IL-18 montrent des taux d'IL-17A et d'IL-22 significativement diminués par rapport aux souris non traitées (Figure 28).



**Figure 29 : Impact de l'IL-18 dans l'agression pulmonaire aiguë avec la souche CHA (T3SS+)**

A,B,C,D,E Analyse des souris *Wt* (blanc) et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> (noir) non infectées (PBS) ou infectées avec la souche CHA (Pa) traitées (hachures) ou non avec de l'IL-18 recombinante murine A, Expression des peptides antimicrobiens inductibles mBD-2, mBD-3, mBD-4 et mBD-10) dans les cellules pulmonaires totales rapportées à l'expression du gène de la β-actin (fold expression). B, Expression des peptides antimicrobiens constitutifs mBD-1, Reg3γ dans les cellules pulmonaires totales rapportées à l'expression du gène de la β-actin (fold expression). C, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. D, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. E, Formule cellulaire dans les liquides de lavages bronchoalvéolaires en nombre de cellules par mL. A,B,C,D,E (n=5 par groupe) \*p<0,05 \*\*p<0,01, par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

Parallèlement à cette perte de la réponse Th17, l'expression des peptides antimicrobiens inductibles (mBD-2, mBD-3, mBD-4 et mBD-10) des souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> traitées avec de l'IL-18 est significativement diminuée par rapport aux souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> non traitées (Figure 29A). La charge bactérienne pulmonaire était alors augmentée dans le groupe *Nlrc4*<sup>-/-</sup> traité par rapport

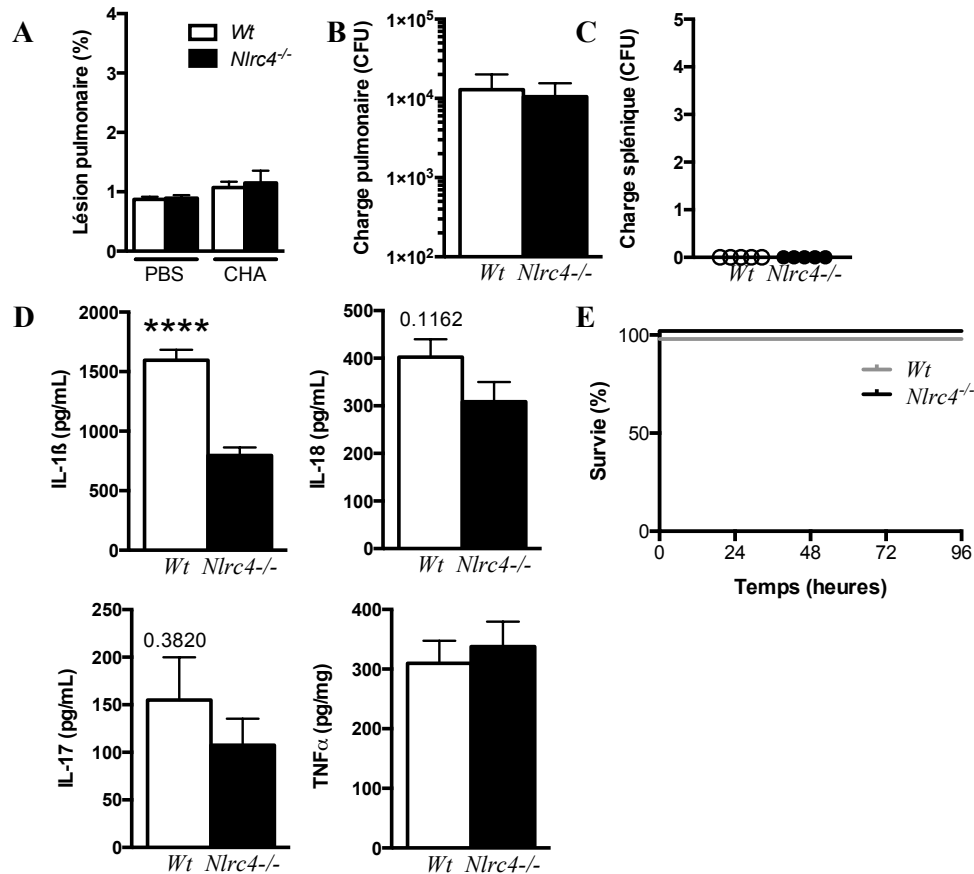


au groupe non traité (Figure 29B), confirmant bien le rôle des peptides antimicrobiens dépendants de la voie Th17 dans l'augmentation de la clairance bactérienne observée chez les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> (Figure 29C, 26B et 21B). Enfin, nous observons une augmentation de la lésion pulmonaire (Figure 29D) dans le groupe des souris traitées par l'IL-18, parallèlement à une augmentation du recrutement des polynucléaires neutrophiles majorant l'inflammation dans les voies aériennes inférieures (Figure 29E).

### **5) Le modèle d'agression pulmonaire aiguë nécessite un inoculum bactérien suffisant**

Franchi *et al* avaient déjà étudié le rôle de NLRC4 dans un modèle de pneumonie aiguë à *P. aeruginosa* avec la souche PAK (Tableau 11). Aucune différence n'avait été relevée par les auteurs entre les souris C57BL/6J *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup>. Cependant, l'inoculum utilisé était faible ( $5.10^5$  UFC/souris). Nous avons reproduit ces résultats avec la souche CHA.

En effet, pour un inoculum aussi faible, aucune lésion pulmonaire significative n'est induite (Figure 30A). Aucune différence dans la réponse de l'hôte n'est observée entre les souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> (figure 27D). En conséquence, aucune différence n'est observée pour la clairance bactérienne (Figure 30B) ni pour la dissémination bactérienne secondaire (Figure 30C). L'inoculum n'induit aucune mortalité à 96 heures (Figure 30E). Cet inoculum semble donc plus relever de la colonisation que de l'infection et est donc insuffisant pour mettre en évidence des différences dans la réponse immune de l'hôte.



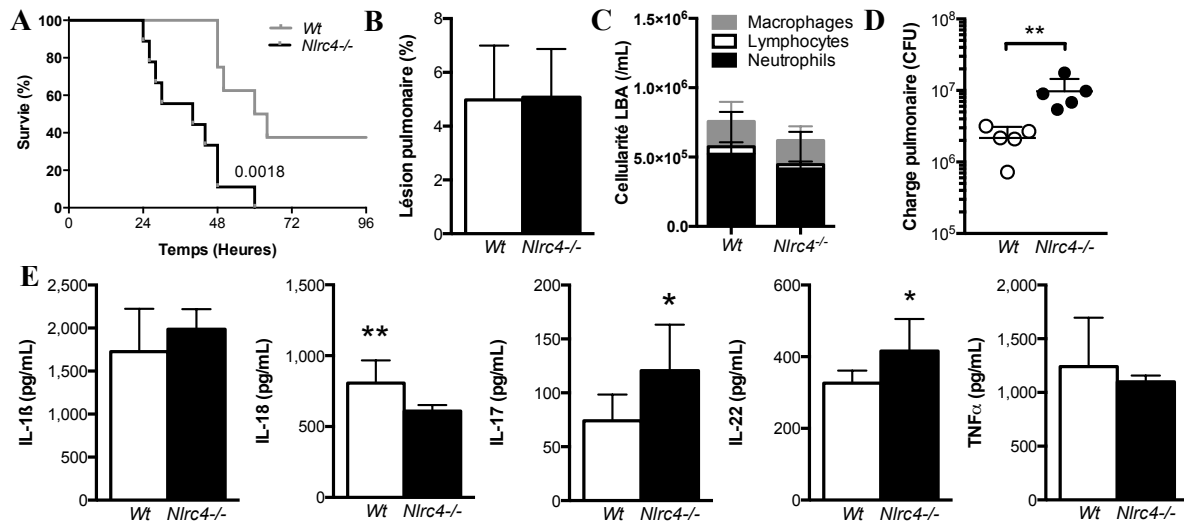
**Figure 30 : Un inoculum insuffisant n'entraîne pas de lésion pulmonaire ni d'activation du NLRC4-inflammasome**  
 A,B,C,D,E Modèle d'agression pulmonaire aiguë réalisée avec un inoculum infectant faible ( $5.10^5$  UFC/souris) A, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. B, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. C, Dissémination bactérienne estimée en UFC par étalement et dilution d'homogénats spléniques. D, Dosage de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18, l'IL-17 et le TNF $\alpha$ , dans les surnageants des LBA des souris *Wt*, et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> par méthode ELISA. (n=5 par groupe) E, Survie à 96 heures. A,B,C,D,E (n=5 par groupe) \*\*\*\*p<0,001, par un t-test la barre d'erreur représente l'écart-type.

### Chapitre 3 : Intérêt de l'inflammasome au cours de l'infection pulmonaire par *P. aeruginosa* n'exprimant pas de système de sécrétion de type III (T3SS-).

#### 1) Le NLRC4 inflammasome participe à la clairance bactérienne pulmonaire des souches T3SS-

Nous avons ensuite infecté des souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> avec une souche possédant un SST3 non fonctionnel (CHA $\Delta$ popBD, Tableau 12), ne pouvant exprimer les protéines popB et popD du translocon, système coiffant la structure en aiguille du SST3 et permettant de créer un pore dans la membrane de la cellule hôte. Bien que ne possédant qu'un SST3 non-fonctionnel, cette souche dispose d'un flagelle, dont la protéine FliC est reconnue par le NLRC4-inflammasome. Nous avons donc évalué l'intérêt de l'inflammasome dans notre modèle

d'agression pulmonaire aiguë à 24 heures. Le SST3 étant un facteur de virulence majeur de la bactérie, il est donc nécessaire d'augmenter l'inoculum infectant d'un log pour obtenir une mortalité dans les expériences de survie à 96 heures et une lésion pulmonaire dans le modèle d'agression pulmonaire aiguë.



**Figure 31 : Analyse de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë comparant souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> infectées avec la souche CHAΔpopBD (T3SS-)**

A,B,C,D,E Analyse des souris infectées par la souche CHAΔpopBD (T3SS-) A, Survie à 96 heures. Analyse statistique réalisée par le test du log-rank. B, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. C, Formule cellulaire dans les Lavages bronchoalvéolaires. D, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. E, Dosage de l'IL-1β, l'IL-18, l'IL-17, l'IL-22 et le TNFα, dans les surnageants des LBA des souris *Wt*, *Nlrc4*<sup>-/-</sup> par méthode ELISA B,C,D,E (n=5 par groupe) \*p<0,05 \*\*p<0,01 par t-test, la barre d'erreur représente l'écart-type.

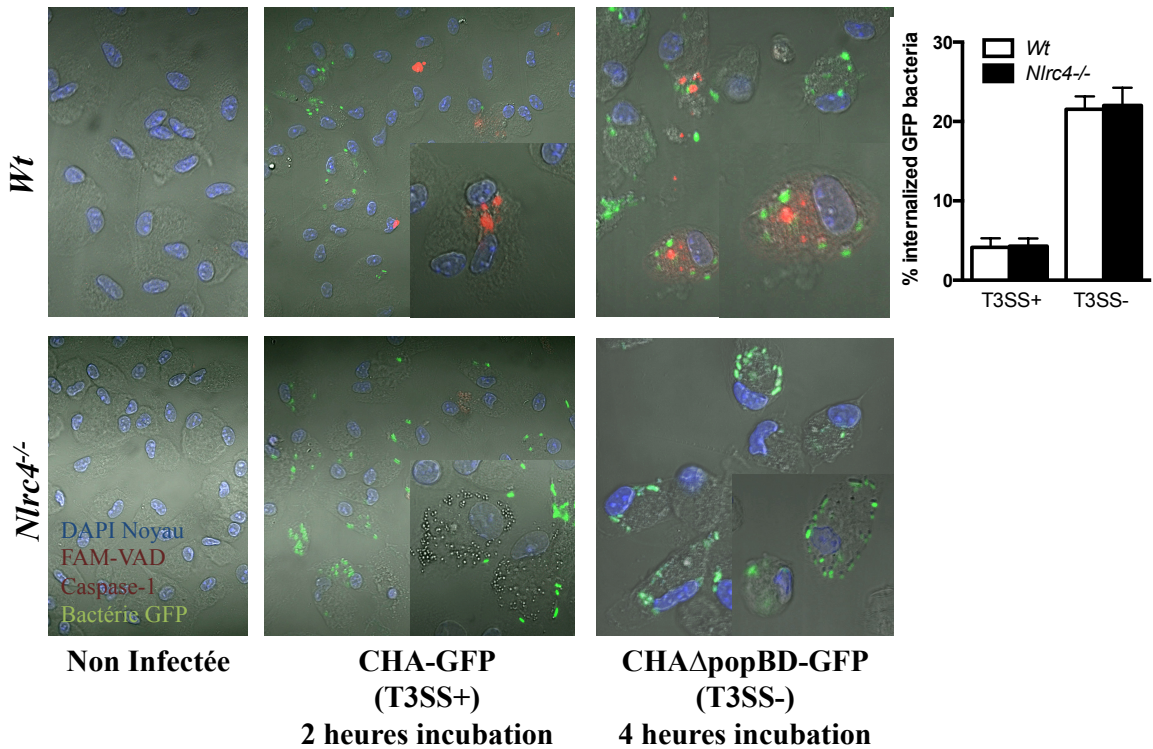
Dans notre expérience de survie à 96 heures, à l'inverse des résultats obtenus avec la souche possédant un T3SS fonctionnel (T3SS+), les souris *Wt* survivent significativement plus longtemps que les souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> lors d'une infection par une souche exprimant un SST3 non fonctionnel (Figure 31A). Aucune différence n'est observée pour la lésion pulmonaire (Figure 31B) ou pour le recrutement cellulaire dans les LBA (Figure 31C). En revanche, on observe une augmentation significative de la charge bactérienne pulmonaire dans les poumons des souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup> (Figure 31D) pouvant expliquer la différence de survie (Figure 31A). L'analyse de la réponse cytokinique ne montre pas de différence de taux d'IL-1β dans les surnageants des LBA des souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup>. Par contre, l'IL-18 est significativement augmentée dans les LBA des souris *Wt* (Figure 31E). Parallèlement, nous retrouvons les mêmes profils que précédemment dans les LBA des souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup>, avec une augmentation de l'IL-17A et de l'IL-22 (Figure 31E). Aucune différence n'est retrouvée pour le TNFα (Figure 31E). En

conséquence, l'activation du NLRC4-inflammasome participe à la clairance du pathogène des voies aériennes au cours des infections pulmonaires aiguës à *P. aeruginosa* T3SS-.

## **2) L'absence d'un SST3 fonctionnel augmente l'internalisation des bactéries dans les macrophages.**

Le rôle essentiel du NLRC4-inflammasome a été décrit principalement au cours des infections bactériennes à réplication intracellulaire telles que *Listeria monocytogenes* ou *Legionella pneumophila*. Au cours des infections par ces pathogènes intracellulaires, le flagelle du pathogène active le NLRC4-inflammasome, ce qui conduit à la mort cellulaire pyroptotique de la cellule infectée, exposant le pathogène aux cellules professionnelles phagocytaires, recrutées par la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18. Au cours de ces infections, les souris NLRC4-déficientes ne pourront reconnaître le pathogène se répliquant à bas bruit à l'intérieur des cellules conduisant au décès de l'hôte. Nous avons donc regardé si l'absence d'un SST3 fonctionnel avait un impact sur le mode de réplication de la bactérie. Nous avons pour cela infecté des macrophages péritonéaux *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> avec les souches CHA et CHA $\Delta$ popBD exprimant une green fluorescent protein (GFP) et marqué la caspase-1. Les cellules ont été lavées 7 fois au PBS et incubées une heure avec de la ceftazidime(189) pour s'affranchir des bactéries extracellulaires puis ont été analysées en microscopie confocale.

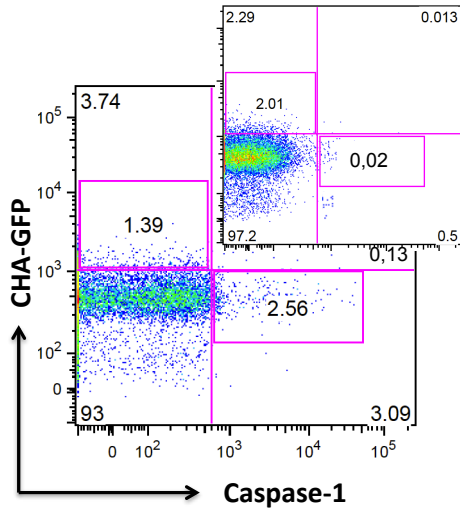
Ainsi on retrouve une augmentation de l'internalisation de *P. aeruginosa* lorsque celui-ci n'exprime pas un SST3 fonctionnel (T3SS-/CHA $\Delta$ popBD-GFP) rendant la souche T3SS-beaucoup plus intracellulaire (Figure 32A et 32B). De plus nous avons remarqué que la souche CHA $\Delta$ popBD-GFP nécessitait un temps d'incubation plus long pour activer la caspase-1 (spot rouge Figure 32A) et que cette activation n'avait lieu que lors d'une colocalisation avec une bactérie présente dans le cytoplasme (spot vert Figure 32A). Par contre, lorsque les macrophages sont infectés avec la souche CHA possédant un SST3 fonctionnel (T3SS+), nous observons une activation de la caspase-1 (spot rouge, Figure 32A) sans colocalisation de bactérie-GFP, suggérant une activation de l'inflammasome via le SST3 alors que la bactérie reste extracellulaire (Figure 32A). Pour confirmer cette hypothèse la même expérience a été réalisée selon les mêmes modalités et les cellules infectées avec la souche CHA-GFP (T3SS+) ont été analysées par cytométrie en flux.



**Figure 32 : L'absence d'un SST3 fonctionnel augmente l'internalisation de *P. aeruginosa***

Analyse par microscopie confocale de macrophages péritonéaux *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> (50 000 cellules par puits). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu), la caspase-1 au 660-FLICA (rouge) et infectées pendant 2 heures et 4 heures respectivement avec les souches CHA-GFP (T3SS+, vert) et CHAΔpopBD-GFP (T3SS-, vert) à MOI 10. Les cellules ont été lavées au PBS et incubées avec un antibiotique (Ceftazidime) pendant 1 heure pour éliminer les bactéries extracellulaires.

Nous confirmons que la souche CHA-GFP est faiblement internalisée (moins de 5%). De plus, l'activation de la caspase-1 est observée majoritairement lorsque les macrophages n'ont pas de bactéries internalisées (Figure 33) confirmant l'observation réalisée en microscopie confocale (Figure 32).



**Figure 33 : Analyse de l'activation de la caspase-1 par la souche T3SS+ (CHA) par cytométrie en flux**

Les macrophages péritonéaux de souris *Wt* (grand graphique) et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> (petit graphique) ont été infectés avec la souche CHA-GFP (T3SS+) et marqués avec la 660-FLICA puis traités avec de la Ceftriaxone et lavés au PBS pour éliminer les bactéries extracellulaires ainsi que les bactéries adhérentes à la membrane cellulaire. (2 heures d'incubation, MOI 10, 200 000 événements ont été enregistrés)

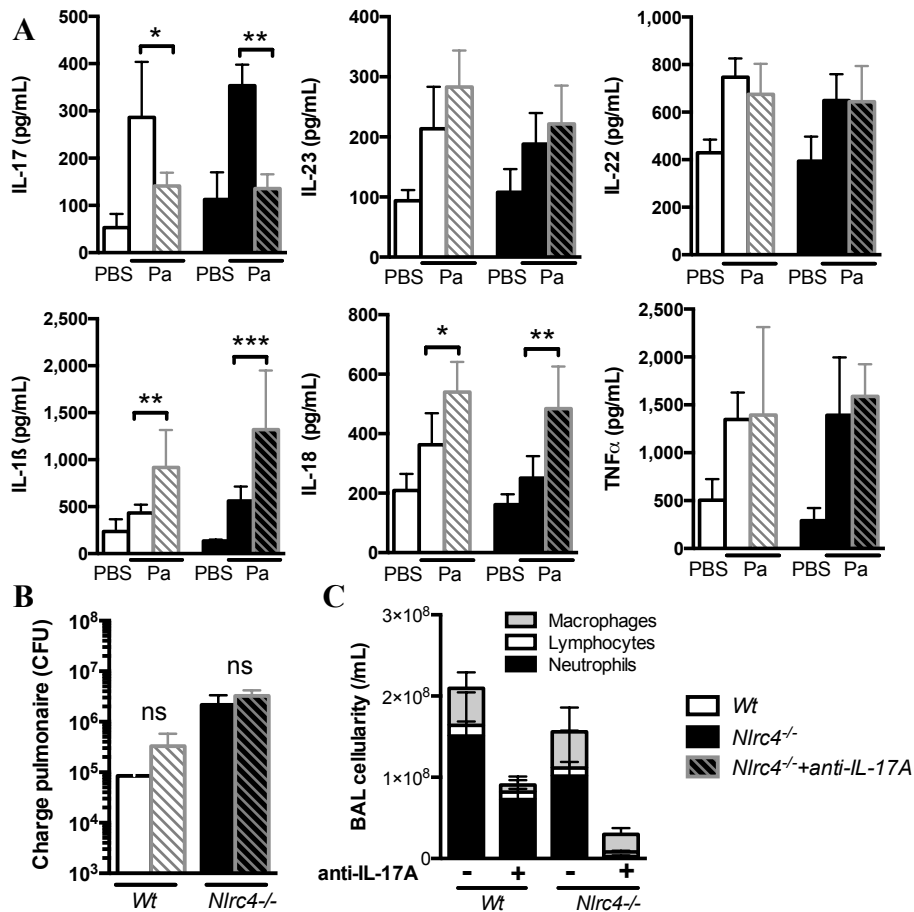
La souche CHA sauvage semble donc activer le NLRC4-inflammasome en demeurant extracellulaire grâce à son SST3, conduisant à une pyroptose futile de macrophages non infectés, diminuant les capacités phagocytaires de l'hôte tout en augmentant l'inflammation et les lésions cellulaires. A l'inverse, la souche mutée CHA $\Delta$ popBD, perdant la fonctionnalité de son SST3 est plus internalisée dans le cytoplasme de l'hôte et nécessite donc l'activation du NLRC4-inflammasome pour être exposée aux cellules phagocytaires et permettre sa clairance, expliquant ainsi les résultats obtenus *in vivo* dans notre modèle d'infection pulmonaire aiguë.

### **3) L'expression de peptides antimicrobiens ne permet pas la clairance de la souche intracellulaire CHA $\Delta$ popBD dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë**

Les peptides antimicrobiens, et particulièrement les  $\beta$ -défensines murines (mBD-x), sont excrétées par les cellules épithéliales pulmonaires dans le milieu extracellulaire et ont ainsi une activité bactéricide dirigée contre les bactéries extracellulaires à Gram négatif. Nous avons donc infecté les souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> avec la souche CHA $\Delta$ popBD (T3SS-). Un groupe de souris de chaque génotype recevait un anticorps anti-IL-17A par voie intra-péritonéale, les autres recevaient du PBS comme contrôle.

Contrairement aux infections avec une souche T3SS+, l'activation de la voie Th17 ne semble pas contributive dans les infections avec une souche intracellulaire T3SS-. En effet, l'antagonisation de cette voie par un anticorps anti-IL-17A permettait bien de diminuer la

sécrétion d'IL-17A (Figure 34A) dans les LBA, et par conséquent de diminuer l'expression des peptides antimicrobiens inductibles (Figure 35A). Mais, contrairement au modèle utilisant une souche possédant un T3SS fonctionnel (T3SS+) (Figure 32C), la perte de l'expression des peptides antimicrobiens n'avait aucune incidence sur la clairance bactérienne pulmonaire de la souche ayant un T3SS non fonctionnel (T3SS-) (Figure 34B).

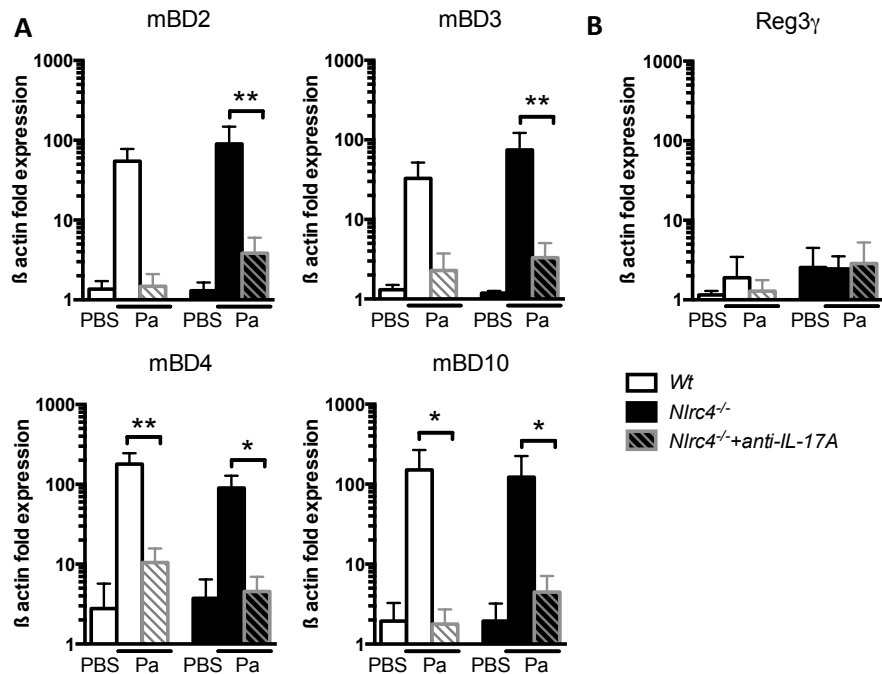


**Figure 34 : Impact de l'antagonisation de la voie Th17 par un anticorps anti-IL-17A dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë avec la souche T3SS-**

A,B,C, Analyse des souris *Wt* (blanc) et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> (noir) non infectées (PBS) ou infectées avec la souche CHAΔpopBD (Pa) traitées (hachures) ou non avec un anticorps anti-IL-17A. A, Dosage de l'IL-17, l'IL-23, l'IL-22 l'IL-1β l'IL-18 et le TNFα dans les surnageants des LBA des souris *Wt*, *Nlrc4*<sup>-/-</sup> par méthode ELISA. B, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. C, Formule cellulaire dans les lavages bronchoalvéolaires (par /mL). A,B,C (n=5 par groupe) \*\*\*p<0,001 \*\*p<0,01 \*p<0,05, par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

L'analyse de la cellularité dans les LBA montre une baisse du recrutement des polynucléaires neutrophiles dans les groupes traités avec l'anticorps anti-IL-17A par rapport aux groupes contrôles (Figure 34C) confirmant le rôle de l'IL-17A dans le recrutement précoce des neutrophiles. Ainsi, l'augmentation de la mortalité observée lors d'une infection avec la

souche intracellulaire T3SS- semble due à l'absence de reconnaissance du pathogène par le NLRC4-inflammasome et à l'absence associée d'une réponse bactéricide liée aux peptides antimicrobiens inductibles sur les bactéries intracellulaires.



**Figure 35 : Expression des peptides antimicrobiens lors d'une infection pulmonaire avec la souche T3SS-**  
A,B, Analyse des souris *Wt* (blanc) et *Nlrc4<sup>-/-</sup>* (noir) non infectées (PBS) ou infectées avec la souche CHAΔpopBD (Pa) traitées (hachures) ou non avec un anticorps anti-IL-17A. A, Expression des peptides antimicrobiens inductibles mBD-2, mBD-3, mBD-4 et mBD-10 dans les cellules pulmonaires totales rapportées à l'expression du gène de la β-actin (fold expression). B, Expression de Reg3γ dans les cellules pulmonaires totales rapportées à l'expression du gène de la β-actin (fold expression). (n=5 par groupe) \*p<0,05 \*\*p<0,01 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

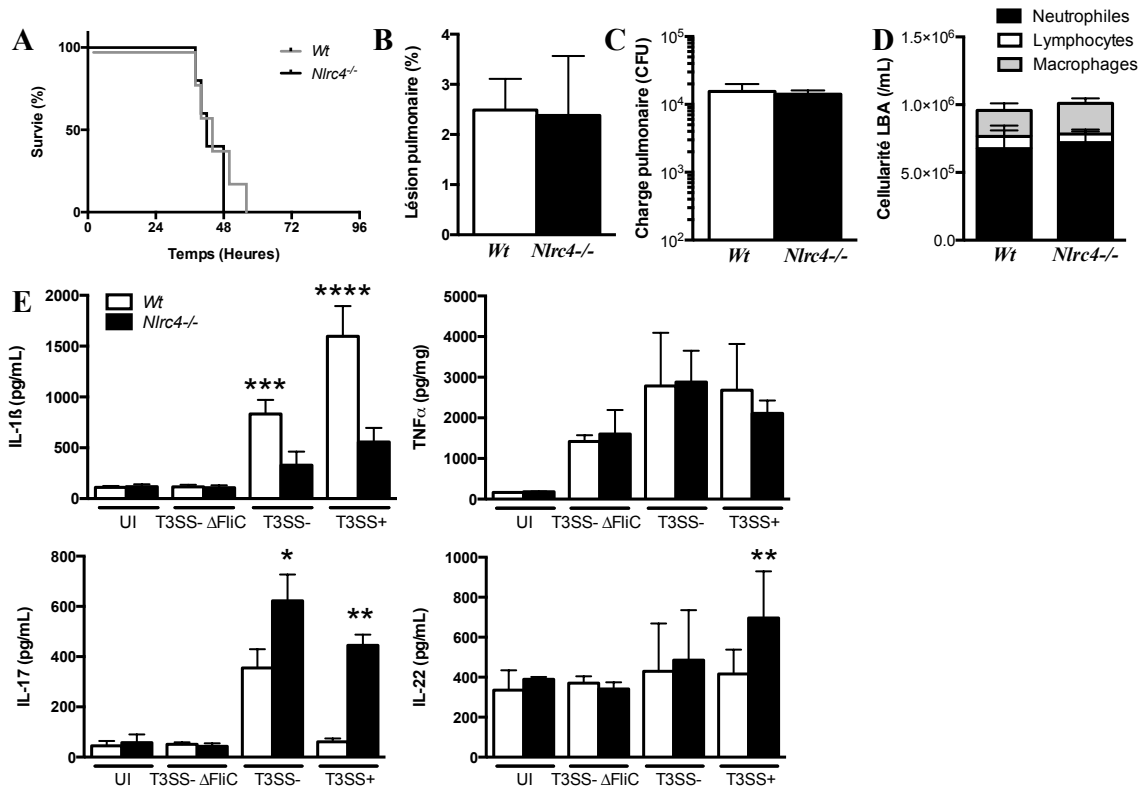
## Chapitre 4 : La protéine FliC du flagelle participe à la clairance des souches extracellulaires et intracellulaires de *P. aeruginosa*.

### 1) FliC permet la reconnaissance de la souche T3SS- par le NLRC4-inflammasome in vivo

Le NLRC4-inflammasome est activé par le SST3 mais aussi par le flagelle *in-vitro*. Nous avons voulu vérifier si le flagelle, et particulièrement la protéine FliC, était bien responsable de la meilleure survie (Figure 28A) et de la meilleure clairance bactérienne pulmonaire



(Figure 28D) observées chez les souris *Wt* infectées par la souche T3SS- (CHA $\Delta$ popBD) par rapport aux souris *Nlrc4*<sup>-/-</sup>. Nous avons donc infecté les souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> avec la souche CHA $\Delta$ popBD $\Delta$ FliC n'exprimant pas la protéine FliC et ayant donc à la fois SST3 et un flagelle tous deux non fonctionnels.



**Figure 36 : Intérêt de la reconnaissance du flagelle par le NLRC4-inflammasome dans un modèle murin d'agression pulmonaire avec la souche T3SS- $\Delta$ FliC (CHA $\Delta$ popBD $\Delta$ FliC)**

A,B,C,D Analyse des souris infectées avec la souche CHA $\Delta$ popBD $\Delta$ FliC (T3SS- $\Delta$ FliC) A, Survie à 96 heures. B, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. C, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. D, Formule cellulaire dans les Lavages bronchoalvéolaires. E, Dosage de l'IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-17 et IL-22 dans les surnageants des LBA des souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> infectés avec les souches CHA (T3SS+), CHA $\Delta$ popBD (T3SS-) et CHA $\Delta$ popBD $\Delta$ FliC (T3SS- $\Delta$ FliC) par méthode ELISA (n=8 par groupe) \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

En l'absence des deux ligands reconnus par le NLRC4-inflammasome aucune différence n'est observée pour la survie à 96 heures (Figure 36A), la lésion pulmonaire (Figure 36B), la clairance bactérienne pulmonaire (Figure 36C) et le recrutement cellulaire dans les LBA (Figure 36D).

Nous avons ensuite comparé les dosages de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-17, l'IL-22 et du TNF $\alpha$  dans les LBA des souris infectées par la souche CHA $\Delta$ popBD $\Delta$ FliC, CHA $\Delta$ popBD et CHA. Aucune différence n'est constatée pour l'IL-1 $\beta$  en l'absence d'un SST3 fonctionnel et du flagelle

(Figure 36C), les motifs du pathogène reconnus par de NLRC4. Ainsi, la protéine FliC du flagelle conduit à l'activation du NLRC4-inflammasome et permet la détection intracellulaire et la clairance de CHA $\Delta$ popBD (Figure 31D) à l'instar des autres pathogènes à réplication intracellulaire. En l'absence de FliC et du SST3, aucune différence n'est observée entre les souris *Wt* et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> (Figure 36A, 36B, 36C, 36D).

Nous avons donc montré qu'en l'absence de la protéine FliC, nous n'observons pas de sécrétion d'IL-17 dans les surnageants des BAL en réponse à *P. aeruginosa* (Figure 33C), alors que cette voie semble essentielle pour la clairance bactérienne des souches possédant un SST3 fonctionnel (Figure 19A, 21B, 26B, 27C, 29C). De plus nous avons mis en évidence que la reconnaissance du flagelle par le récepteur cytoplasmique NLRC4 contribuait à la clairance des souches intracellulaires de *P. aeruginosa* ne possédant pas de SST3 fonctionnel (Figure 31A et 31D). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un autre récepteur de l'immunité innée, cette fois-ci membranaire et pouvant par conséquent reconnaître des motifs de bactéries extracellulaires, pouvait reconnaître le flagelle de *P. aeruginosa* et initier la voie Th17 impliquée dans la clairance des souches extracellulaires possédant un SST3 fonctionnel (Figure 23,25, 26A).

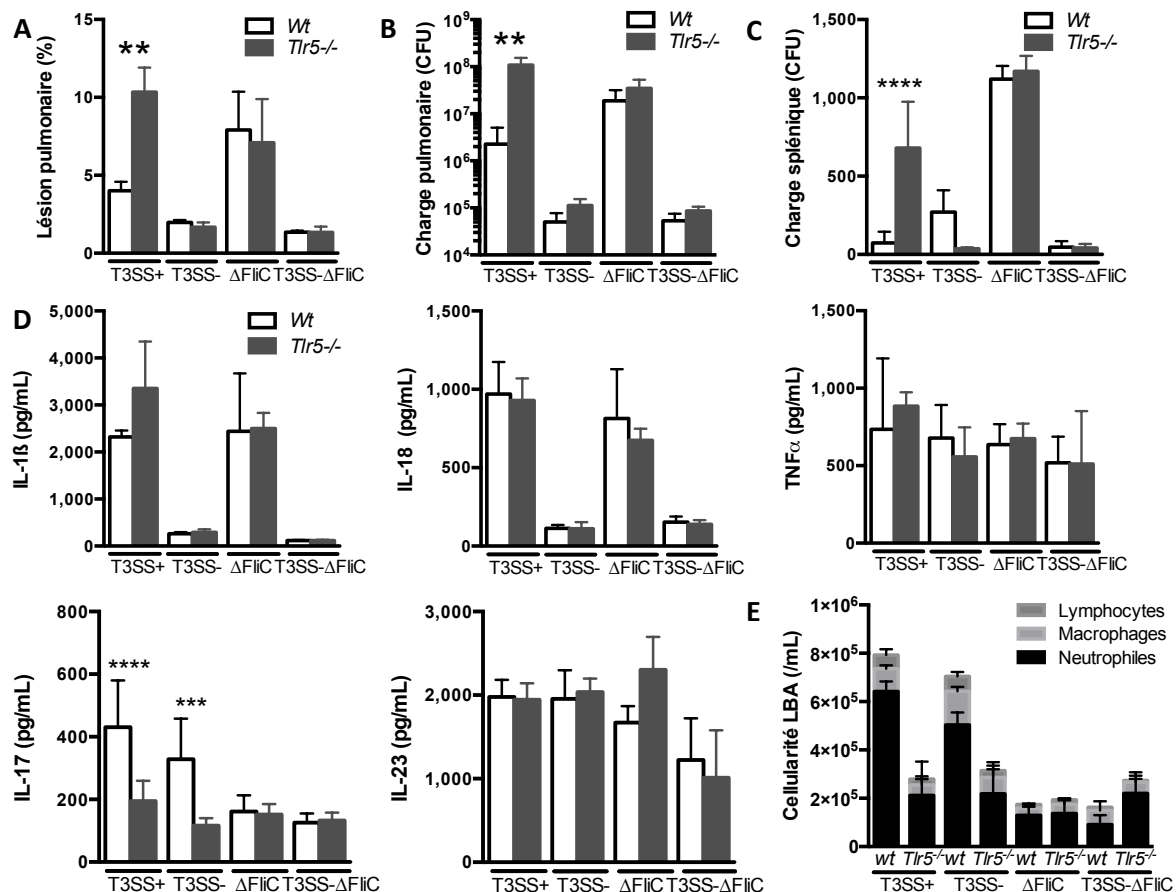
## **2) La reconnaissance du flagelle par TLR5 participe à la réponse Th17 et à la clairance bactérienne de la souche extracellulaire T3SS+**

Le Toll-like receptor 5 (TLR5), un autre pattern recognition receptor (PPR) appartenant à la famille des Toll-like receptors (TLRs) membranaires est capable de reconnaître la protéine FliC du flagelle de bactéries extracellulaires comme *P. aeruginosa* et permet d'activer le facteur de transcription NF $\kappa$ B, nécessaire à la production d'IL-17A. Nous avons donc infecté par voie intra-nasale des souris *Wt* et *Tlr5*<sup>-/-</sup> avec les souches extracellulaires CHA et CHA $\Delta$ FliC (mutée sur le flagelle), les souches intracellulaires CHA $\Delta$ popBD ayant un SST3 non fonctionnel (T3SS-) ainsi que la souche double mutante ( $\Delta$ FliC $\Delta$ popBD). Les souris ont été sacrifiées à la 24<sup>e</sup> heure.

Aucune différence n'est mise en évidence pour la lésion pulmonaire (Figure 347), la charge bactérienne (Figure 37B) et la dissémination bactérienne (Figure 37C) lorsque les souris *Wt* et *Tlr5*<sup>-/-</sup> sont infectées avec une souche intracellulaire ( $\Delta$ popBD ou  $\Delta$ popBDFliC). Les mêmes observations sont faites au niveau de la réponse cytokinique dans les surnageants des LBA (Figure 37D) à l'exception du taux d'IL-17 significativement augmenté chez les souris *Wt*

infectées avec la souche flagellée T3SS- comparées aux souris *Tlr5*<sup>-/-</sup> infectées avec la même souche et aux souris infectées avec la souche T3SS-ΔFliC. Toutefois comme nous l'avons vu précédemment (Figure 34B), l'activation de la voie Th17 n'a aucune incidence sur la clairance bactérienne des souches intracellulaires (Figure 37B).

Cependant, lorsque les souris sont infectées avec la souche extracellulaire et flagellée (T3SS+), il existe une diminution de la lésion pulmonaire (Figure 37A), une augmentation de la clairance bactérienne (Figure 37B) et une diminution de la dissémination bactérienne secondaire (Figure 37C) chez les souris *Wt* par rapport aux souris *Tlr5*<sup>-/-</sup>.



**Figure 37 : Implication de TLR5 dans la reconnaissance du flagelle et de l'activation de la voie Th17 au cours des infections pulmonaires avec la souche extracellulaire T3SS+ et intracellulaire T3SS-**

A,B,C,D Analyse des souris infectées avec les souches CHA (T3SS+), CHAΔpopBD (T3SS-), CHAΔFliC (ΔFliC), CHAΔpopBDΔFliC (T3SS-ΔFliC) A, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. B, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. B, Dissémination bactérienne en UFC estimée par étalement et dilution d'homogénats spléniques. D, Dosage de l'IL-1β, l'IL-18, le TNFα, IL-17 et IL-23 dans les surnageants des LBA des souris Wt et *Nlr4*<sup>-/-</sup> par méthode ELISA (n=10 par groupe) E, Formule cellulaire dans les Lavages bronchoalvéolaires. \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

Parallèlement une augmentation de l'IL-17A est retrouvée dans les LBA des souris *Wt* par rapport aux souris *Tlr5<sup>-/-</sup>*, sans autre différence dans la réponse cytokinique (Figure 34D). Enfin, ce bénéfice est neutralisé (Figure 37A, 37B, 37C) lorsque les souris sont infectées avec la souche  $\Delta$ FliC, incapable d'être reconnue par TLR5 et ne pouvant induire d'IL-17A (Figure 37D). L'analyse de la cellularité dans les LBA confirme les observations antérieures et montre que l'IL-17A participe précocement au recrutement des polynucléaires neutrophiles dans les voies aériennes de l'hôte (Figure 37E).

En conclusion, la reconnaissance de la protéine FliC du flagelle est une étape critique dans le contrôle des infections pulmonaires aiguës à *P. aeruginosa*. Deux PRRs sont impliqués dans cette reconnaissance, NLRC4 pour les formes intracellulaires de *P. aeruginosa* ne possédant pas un SST3 fonctionnel (T3SS-), permettant d'activer l'inflammasome (Figure 31A et 31D) et TLR5 pour les formes extracellulaires possédant un système de sécrétion de type 3 fonctionnel (T3SS+), permettant d'initier une réponse IL-17A précoce (Figure 23, 25, 26A, 37D).

## **Chapitre 5 : L'inhibition de l'inflammasome : cible thérapeutique ?**

Alors que le pipeline des antibiotiques contre les infections par bactéries à Gram négatif se tarit le nombre de résistances bactériennes aux antibiotiques augmente, rendant indispensable le développement de nouvelles approches thérapeutiques alternatives et/ou adjuvantes. L'immunomodulation de la réponse immunitaire innée de l'hôte fait partie de ces perspectives thérapeutiques d'avenir. Les résultats encourageants obtenus ici font du NLRC4-inflammasome une cible thérapeutique potentielle d'intérêt. C'est pourquoi, nous avons évalué l'intérêt de traitement inhibiteur spécifique du NLRC4-inflammasome sur notre modèle murin de pneumonie aiguë à *P. aeruginosa*. Trois traitements ont été évalués (Figure 38) :

- Un anticorps monoclonal anti-PKC $\delta$  (protéine kinase C delta)
- La colistine (ou polymyxine E) et la polymyxine B
- L'IL-18 binding protein (IL-18BP)

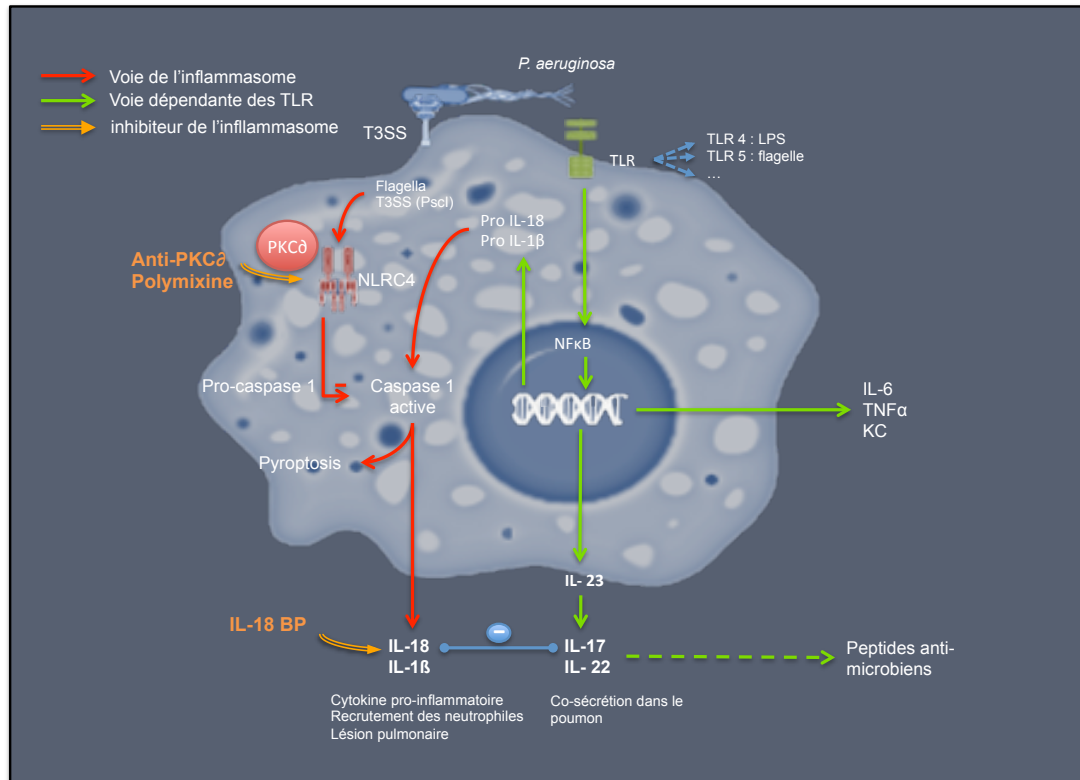
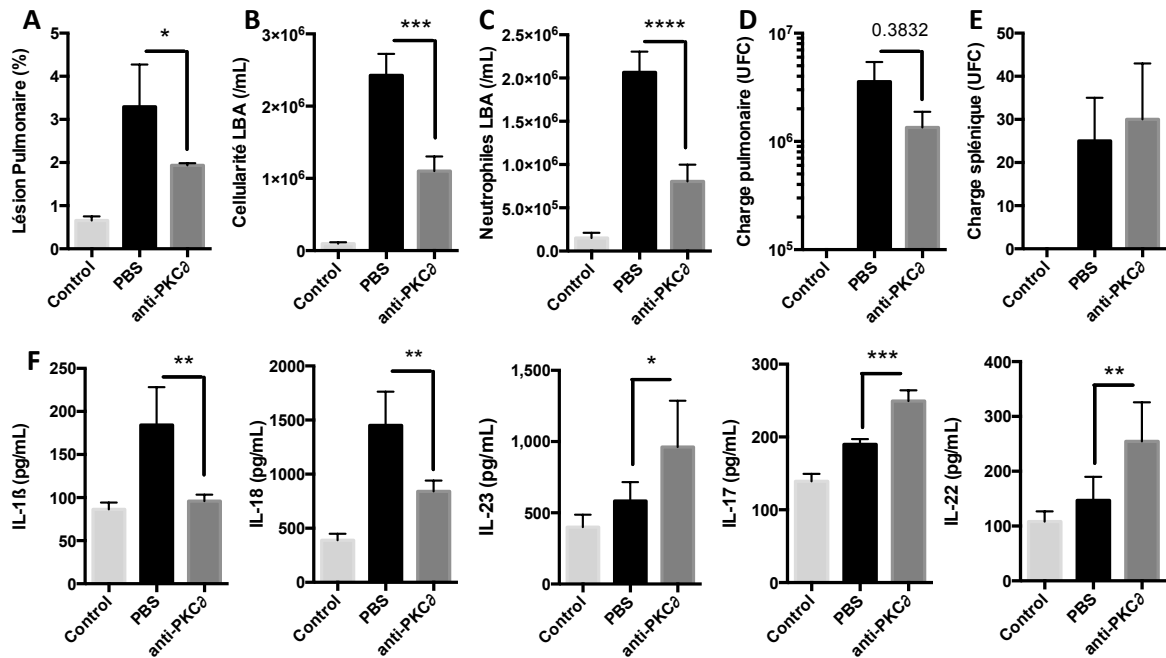


Figure 38 : Thérapeutique inhibitrice du NLRC4-inflammasome

### 1) Intérêt de l'inhibition du NLRC4-inflammasome par un anticorps anti-PKC $\delta$ .

L'activation du NLRC4-inflammasome nécessite plusieurs étapes. Tout d'abord, l'interaction directe entre un récepteur NAIP et un motif spécifique. La liaison entre le complexe Ligand-NAIP et NLRC4 va permettre le changement de conformation de NLRC4. Enfin la phosphorylation de NLRC4 par une kinase, la PKC $\delta$ , va permettre l'activation de la caspase-1 (Figure 38). Outre son rôle dans la phosphorylation de NLRC4, la PKC $\delta$  a une activité large et est impliquée dans de nombreuses voies métaboliques telles que la régulation glycémique, l'excrétion des sucs pancréatiques, faisant craindre de nombreux effets secondaires lors d'une utilisation médicamenteuse. Des souris C57BL/6 *Wt* ont donc été infectées avec la souche CHA et instillées avec du PBS (groupe CHA) comme contrôle négatif, de la PKC $\delta$  recombinante (groupe PKRC $\delta$ ) comme contrôle positif et enfin un anticorps monoclonal anti-PKC $\delta$  murine (groupe anti-PKRC $\delta$ ).

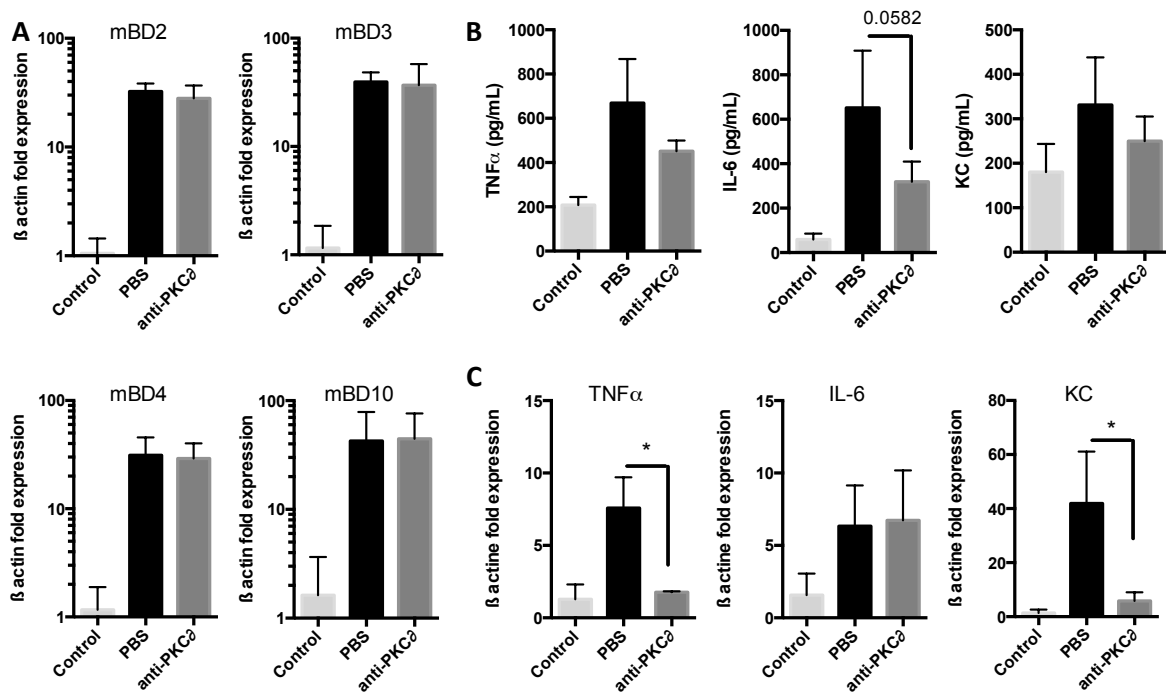


**Figure 39 : Intérêt de l'inhibition du NLRC4-inflammasome par un anticorps anti-PKC $\delta$  dans une pneumonie aiguë avec la souche T3SS+**

A,B,C,D,E,F Analyse des souris infectées avec la souche CHA (T3SS+) et recevant par voie intra-nasale du PBS ou un anticorps anti-PKC $\delta$  (anti-PKC $\delta$ ) A, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. B, Cellularité dans les LBA (nombre de cellules par mL). C, Nombre de polynucléaires neutrophiles dans les LBA (nombre de cellules par mL) D, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. E, Dissémination bactérienne en UFC estimée par étalement et dilution d'homogénats spléniques. D, Dosage de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18, l'IL-23 IL-17 et IL-22 dans les surnageants des LBA des souris par méthode ELISA (n=5 par groupe)\*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

Les souris traitées par l'anticorps anti-PKC $\delta$  présentent une lésion pulmonaire significativement diminuée (Figure 39A) associée à une diminution significative du recrutement des neutrophiles dans les voies aériennes (Figure 39B, 39C) par diminution de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 (Figure 39F) dépendante du NLRC4-inflammasome. Enfin, nous observons une augmentation de l'IL-17A et de l'IL-22 (figure 39F) sans diminution significative de la clairance bactérienne pulmonaire (Figure 39D). Nous avons donc évalué l'expression des peptides antimicrobiens dans les cellules pulmonaires totales. Aucune induction de peptides antimicrobiens n'est retrouvée entre le groupe de souris non traitées et le groupe de souris traitées avec l'anticorps anti-PKC $\delta$ , expliquant l'absence de différence pour la clairance bactérienne (Figure 39D), et ce malgré l'augmentation de l'IL-17A et de l'IL-22 (Figure 39F) dans les surnageants des LBA. Cette observation est consécutive au rôle de la PKC $\delta$  dans les voies de signalisation permettant l'expression des peptides antimicrobiens. Ainsi, en bloquant la PKC $\delta$ , nous empêchons l'activation de l'inflammasome

et diminuons la lésion pulmonaire (Figure 39A) liée à l'inflammation excessive des voies aériennes médiée par l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 (Figure 39F). Cependant, nous empêchons aussi l'expression des peptides antimicrobiens (Figure 39A), d'où l'absence d'effet net total significatif sur la clairance bactérienne (Figure 39D).



**Figure 40 : Analyse de l'expression des peptides antimicrobiens inductibles, du TNF $\alpha$ , KC et de l'IL-6**

A,B,C Analyse des souris infectées avec les souches CHA et recevant par voie intra-nasale du PBS ou un anticorps anti-PKRC $\delta$  (anti-PKC $\delta$ ). A, Expression des peptides antimicrobiens inductibles mBD-2, mBD-3, mBD-4 et mBD-10 dans les cellules pulmonaires totales rapportées à l'expression du gène de la  $\beta$ -actine (fold expression). B, Dosage de TNF $\alpha$ , KC et de l'IL-6 dans les surnageants des LBA des souris par méthode ELISA (n=5 par groupe). C, A, Expression du TNF $\alpha$ , KC et de l'IL-6 dans les cellules pulmonaires totales rapportées à l'expression du gène de la  $\beta$ -actine (fold expression). (n=5 par groupe) \*p<0,05 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

Les PKC $\delta$  sont aussi impliquées dans la phosphorylation de messagers intracellulaires et de facteurs de transcriptions impliqués dans l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B. Nous observons donc une diminution de la sécrétion de TNF $\alpha$ , de l'IL-6 et de KC (Figure 39B) dans les surnageants des LBA ainsi qu'une diminution de l'expression des transcrits de TNF $\alpha$ , d'IL-6 et de KC dans les cellules pulmonaires totales par PCR quantitative (Figure 40C).

En conclusion, l'utilisation d'inhibiteurs de PKC $\delta$  permet de réduire la lésion pulmonaire sans bénéfice sur la clairance bactérienne.

## 2) Intérêt de l'inhibition du NLRC4-inflammasome par la Colistine (Polymyxine E)

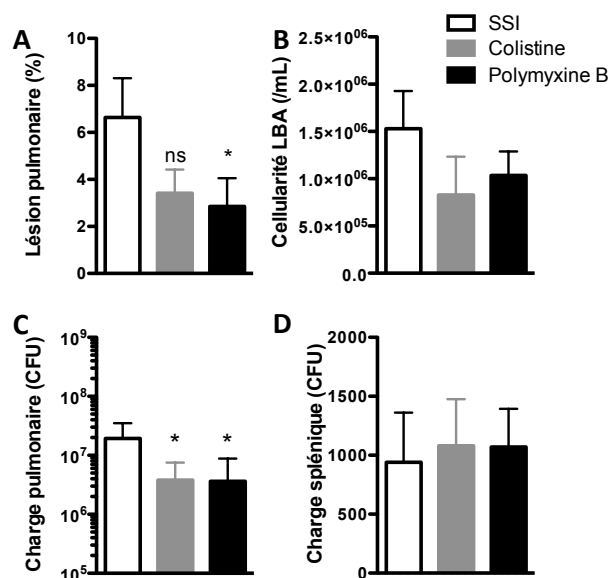
La polymyxine B, une polymyxine distincte de la colistine (aussi appelée polymyxine E) également utilisée comme thérapeutique anti-infectieuse en pratique clinique, a montré un effet inhibiteur de la PKC $\delta$ . Les structures de la polymyxine B et de la colistine étant très proches, nous avons postulé que la colistine, d'utilisation clinique plus répandue, pouvait avoir un effet inhibiteur du NLRC4-inflammasome, indépendamment de son effet bactéricide sur les bactéries à Gram négatif. Cet effet immunomodulateur pourrait donc permettre l'utilisation de la colistine même lorsque l'antibiogramme montre une CMI élevée à cet antibiotique. Nous avons donc réalisé un modèle de pneumonie aiguë en utilisant une souche clinique, PA1293, isolée lors d'une pneumonie aiguë acquise sous ventilation mécanique (PAVM) d'un patient de réanimation de l'hôpital Érasme à Bruxelles. Cette souche possède un SST3 et un flagelle. Pour s'affranchir de tout effet bactéricide de la colistine, cette souche a été choisie car elle possède une résistance acquise à la colistine (cf antibiogramme, tableau 13).

	TIC	PIP	TZP	CAZ	IMI	MER	CIP	AMK	COL	TOB
PA1293	512	512	256	256	16	32	32	256	<b>32</b>	32

Tableau 13 : Antibiogramme de la souche PA1293

Dans cette expérience les souris sont instillées avec un mélange contenant la bactérie et la colistine ou la polymyxine B pour maximiser l'effet immunomodulateur éventuel. Nous observons ainsi une diminution significative de la lésion pulmonaire (Figure 41A) associée à une diminution non significative de la cellularité dans les LBA (Figure 41B) dans le groupe colistine associée à une diminution de la charge bactérienne à 24 heures (Figure 41C) en comparaison du groupe contrôle. Des expériences complémentaires restent à réaliser pour étayer l'analyse de la réponse de l'hôte.



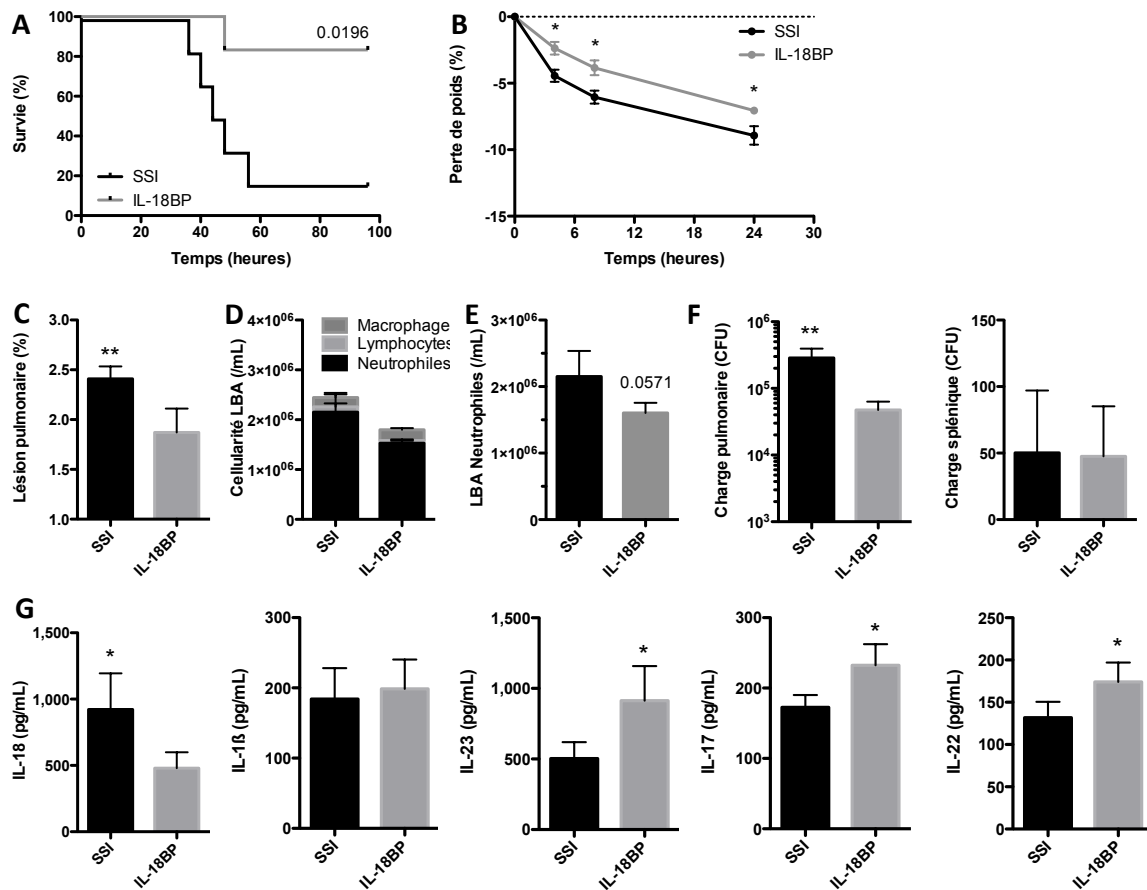


**Figure 41 : Intérêt de l'inhibition du NLRC4-inflammasome par la colistine (polymyxine E) A,B,C,D.** Analyse à 24 heures des souris infectées avec les souches CHA et recevant par voie intra-nasale du SSI ou de la colistine (15 mg/Kg/J de coliméthate sodique) ou de la Polymyxine B (4mg/Kg/J) A, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. B, Cellularité totale des lavages bronchoalvéolaires (nombre de cellules par mL). C, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. D, Dissémination bactérienne en UFC estimée par étalement et dilution d'homogénats spléniques. \*p<0,05 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

### 3) Intérêt de l'inhibition du NLRC4-inflammasome par l'IL-18BP

L'IL-18BP est un récepteur soluble de l'IL-18, agissant comme un tampon, piégeant l'IL-18 secrétée et lui empêchant d'exercer son activité pro-inflammatoire (par activation du facteur NFκB) lors de sa liaison sur son récepteur membranaire (IL-18R). Le groupe de souris traitées à l'IL-18BP par voie intra-péritonéale a reçu ce traitement à H0 puis toutes les 12 heures jusqu'au sacrifice à la 24<sup>e</sup> heure dans le modèle de pneumonie aiguë ainsi que dans l'expérience de survie à 96 heures. Les souris contrôles reçoivent une injection de sérum salé isotonique. La souche utilisée reste la souche CHA (T3SS+). Dans l'expérience de survie, les souris traitées avec l'IL-18BP survivent significativement plus longtemps que les souris non traitées (Figure 42A). Dans notre modèle de pneumonie aiguë les souris sont sacrifiées à la 24<sup>e</sup> heure. La perte de poids, témoin de l'état général des souris au cours de l'infection, est diminuée dans le groupe traité à l'IL-18BP dès la 6<sup>e</sup> heure jusqu'à la 24<sup>e</sup> heure (Figure 42B). La lésion pulmonaire est significativement diminuée (Figure 42C), associée à une diminution du recrutement de cellules inflammatoires prédominant sur les polynucléaires neutrophiles (Figure 42D, 42E) en relation avec la diminution de l'IL-18 (Figure 42G) dans les LBA des souris traitées avec l'IL-18BP. L'analyse des cytokines dans les LBA ne montre pas de

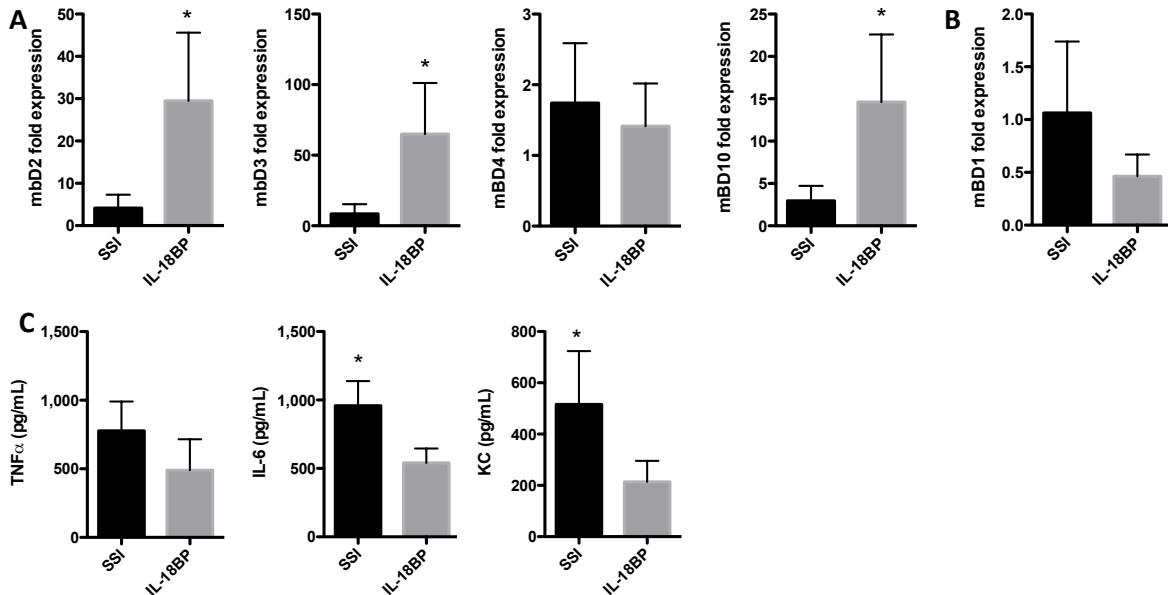
différence pour l'IL-1 $\beta$  (Figure 42G) et montre une augmentation significative des cytokines de la voie Th17 (IL-23, IL-17 et IL-22) dans le groupe IL-18BP.



**Figure 42 : Intérêt de l'inhibition du NLR4-inflammasome par l'IL-18BP dans un modèle murin d'agression pulmonaire avec la souche T3SS+ (CHA)** A,B,C,D,E,F,G Analyse des souris infectées avec les souches CHA et recevant par voie intra-nasale du SSI ou de la l'IL-18BP murine recombinante (50 mg/Kg/J). A, Survie à 96 heures des souris C57BL/6 infectées avec la souche CHA et traitées ou non par l'IL-18BP. Analyse statistique réalisée par un test du log-rank. B, Perte de poids (%). C, lésion pulmonaire (%) calculée par le ratio de concentration poumon/sang d'albumine marquée à la FITC. D, Cellularité et formule cellulaire dans les LBA (nombre de cellules par mL). E, Nombre de polynucléaires neutrophiles dans les LBA (nombre de cellules par mL) F, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. Dissémination bactérienne en UFC estimée par étalement et dilution d'homogénats spléniques. G, Dosage de l'IL-18, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-23 IL-17 et IL-22 dans les surnageants des LBA des souris par méthode ELISA (n=5 par groupe) \*p<0,05 \*\*p<0,01 par un t-test, la barre d'erreur représente l'écart-type.

Cette induction de la voie Th17 induit l'expression des peptides antimicrobiens (Figure 43A) favorisant la clairance bactérienne (Figure 42F). Enfin une diminution de l'IL-6 et de KC est observée dans les LBA des souris traitées à l'IL-18BP par diminution de la stimulation de l'IL-18R (Figure 43C). A la lumière de ces observations, l'IL-18BP semble donc une thérapeutique immunomodulatrice adjuvante potentielle au cours des pneumonies aiguës à *P.*

*aeruginosa* (T3SS+), limitant l'inflammation et favorisant l'expression de peptides antimicrobiens par la voie Th17. Ce traitement permet d'augmenter significativement la survie des souris traitées, bien que la dose d'IL-18BP utilisée soit faible.



**Figure 43 : Analyse de l'expression ds peptides antimicrobiens, du TNF $\alpha$ , KC et de l'IL-6**

A,B,C Analyse des souris infectées avec les souches CHA et recevant par voie intra-nasale du SSI ou de la l'IL-18BP murine recombinante (50 mg/Kg/J). A, Expression des peptides antimicrobiens inductibles mBD-2, mBD-3, mBD-4 et mBD-10 dans les cellules pulmonaires totales rapportées à l'expression du gène de la  $\beta$ -actin (fold expression). B, Expression de mBD-1 dans les cellules pulmonaires totales rapportées à l'expression du gène de la  $\beta$ -actin (fold expression).C, Dosage de TNF $\alpha$ , IL-6 et de KC dans les surnageants des LBA des souris par méthode ELISA (n=5 par groupe). (n=5 par groupe) \*p<0,05 par une ANOVA à mesures répétées, la barre d'erreur représente l'écart-type.

## Chapitre 6 : ratios IL-1 $\beta$ /IL-17 et IL-18/17 : des biomarqueurs pour faciliter l'indication de thérapeutique adjuvante spécifique ?

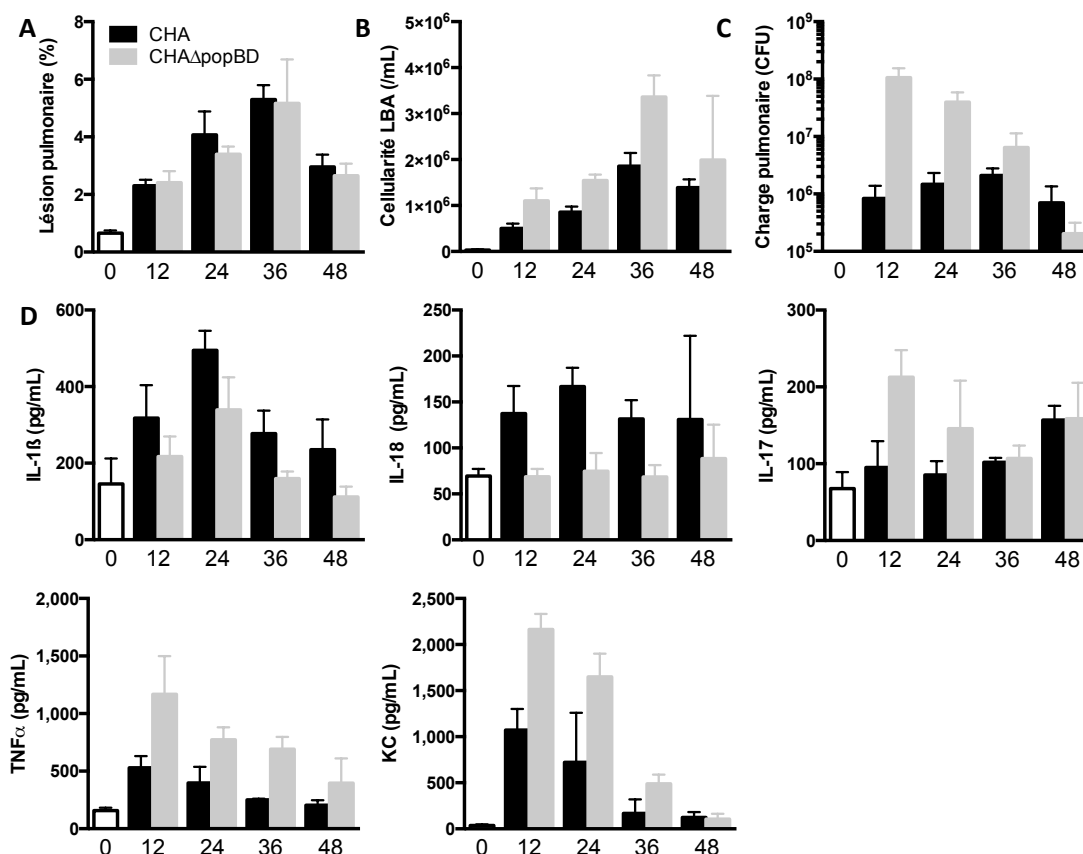
Nous avons donc montré qu'une souche de *P. aeruginosa* possédant un SST3 fonctionnel active fortement le NLRC4-inflammasome et conduit à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 matures dans les LBA. Inversement, lorsqu'une souche ne possède pas un SST3 fonctionnel, celle-ci induit une faible production d'IL-18 et d'IL-1 $\beta$  permettant la sécrétion d'IL-17A (Figure 36D) dans les LBA. Or, ces deux types de souches sont impliquées dans les pneumonies aiguës acquises sous ventilation mécanique (PAVM) en réanimation. Le SST3 est un facteur de virulence majeur dans le contexte de PAVM et la seule présence de l'appareil de sécrétion indépendamment des exotoxines est associée à une augmentation de la

mortalité chez les patients hospitalisés. Dans le cadre des PAVM, toutes les souches ne possèdent pas un SST3 ; en effet, environ 77% des souches l'expriment. Le développement de nouvelles thérapies adjuvantes, telles que les anticorps humanisés anti-PcrV bloquant le SST3, semble prometteur sur modèles animaux et a déjà fait l'objet d'une étude clinique de phase 2. Au vu du coût de ce type de molécule et de la politique actuelle d'économie de santé, l'utilisation de ces biothérapies nécessite de nouveaux outils diagnostiques afin d'affiner les indications et maximiser le ratio efficacité/coût. Ainsi le ratio IL-1 $\beta$  ou IL-18/IL-17 dans les surnageants de LBA ou les prélèvements endotrachéaux permettrait de poser l'indication de ce type de biothérapie spécifiquement dirigé contre le SST3. De plus, ce ratio évaluant la réponse de l'hôte, permettrait de limiter l'indication d'un anticorps anti-SST3 aux situations au cours desquelles le SST3 induit de nombreux dégâts tissulaires alors que son inhibition pourrait apporter un bénéfice maximal. En effet, la recherche du gène *exsA* par PCR permet de confirmer qu'une souche est capable d'exprimer un SST3 mais ne renseigne en rien sur sa fonctionnalité ou son implication dans la symptomatologie du patient.

### **1) Évaluation des ratios avec la souche CHA**

Pour cela nous avons utilisé un modèle d'infection pulmonaire aiguë avec une souche T3SS+ (CHA) et une souche possédant un SST3 non fonctionnel, T3SS- (CHA $\Delta$ popBD). Pour évaluer le ratio IL-1 $\beta$  ou IL-18/IL-17 nous avons ajusté notre modèle d'agression pulmonaire aiguë afin que les souches induisent une lésion pulmonaire comparable. Le SST3 étant un facteur de virulence majeur, les souris instillées avec la souche CHA ont été instillées avec un inoculum de  $5.10^6$  UFC, contre  $5.10^7$  pour la souche CHA $\Delta$ popBD. Dans notre première expérience, nous retrouvons une lésion pulmonaire semblable jusqu'à la 48<sup>e</sup> heure entre les 2 groupes de souris infectées avec les souches CHA et CHA $\Delta$ popBD, avec un maximum à la 36<sup>e</sup> heure (Figure 44A), associée à un recrutement cellulaire maximal (Figure 44B). Comme attendu, la clairance bactérienne de la souche CHA $\Delta$ popBD est plus rapide que la souche CHA (Figure 41C). L'analyse des cytokines montre que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 sont plus élevées dans les surnageants de LBA des souris infectées avec la souche CHA pendant les 36 premières heures après l'infection. A l'inverse, l'IL-17A était augmentée dans les surnageants des souris infectées par la souche CHA $\Delta$ popBD (Figure 44D). Le TNF $\alpha$  et KC étaient plus élevés dans les surnageants des souris CHA $\Delta$ popBD, et directement corrélés à l'inoculum infectant (Figure 44D). L'analyse des ratios IL-1 $\beta$ /IL-17 ainsi que IL-18/IL-17 montre que

ceux-ci peuvent permettre de différencier les infections dues à une souche T3SS+ ou une souche T3SS- à partir de la 24<sup>e</sup> heure jusqu'à la 48<sup>e</sup> heure (Figure 45A, 45B) (cf tableau 14).



**Figure 44 : Analyse cinétique de la réponse de l'hôte dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë avec les souches T3SS+ et T3SS-.** A,B,C les souris sont instillées avec la souche CHA  $5.10^6$  UFC et CHA $\Delta$ popBD  $5.10^7$  UFC et sacrifiées à 12, 24, 36 et 48 heures. A, lésion pulmonaire (%). B, Cellularité totale des LBA (nombre de cellules par mL). C, Charge pulmonaire en UFC par gramme de poumon estimée par étalement et dilution d'homogénats pulmonaires. G, Dosage de l'IL-18, l'IL-1 $\beta$ , IL-17, le TNF $\alpha$  et KC dans les surnageants des LBA des souris par méthode ELISA (n=5 par groupe).

Ratio IL	Valeur	Sensibilité (IC 95%)	Spécificité (IC 95%)	R. de vraisemblance positif
IL-1 $\beta$ /17	<b>2,096</b>	88,24 (63.56-98.54)	91,67 (61.52-99.79)	10,59
IL-18/17	<b>0,9597</b>	100,0 (78.20-100)	92,86 (66.13-99.82)	14

**Tableau 14 : Ratios obtenus dans un modèle cinétique d'agression pulmonaire aiguë avec la souche CHA**

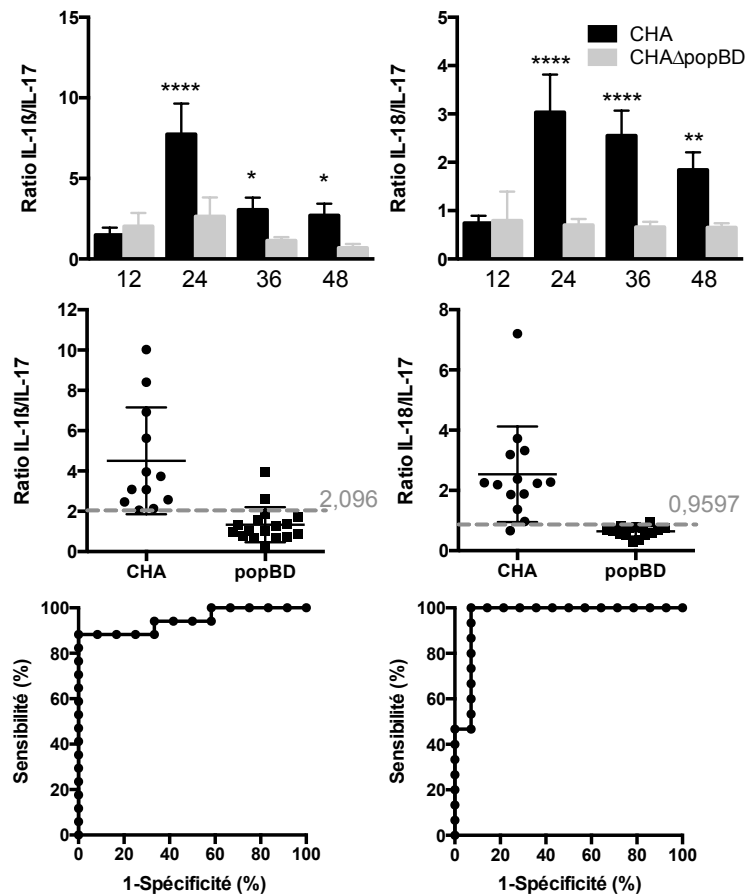
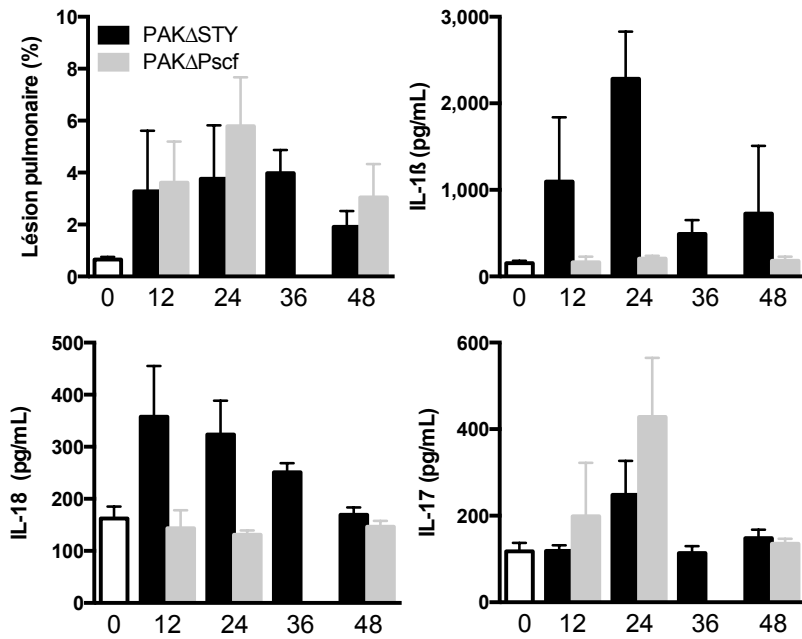


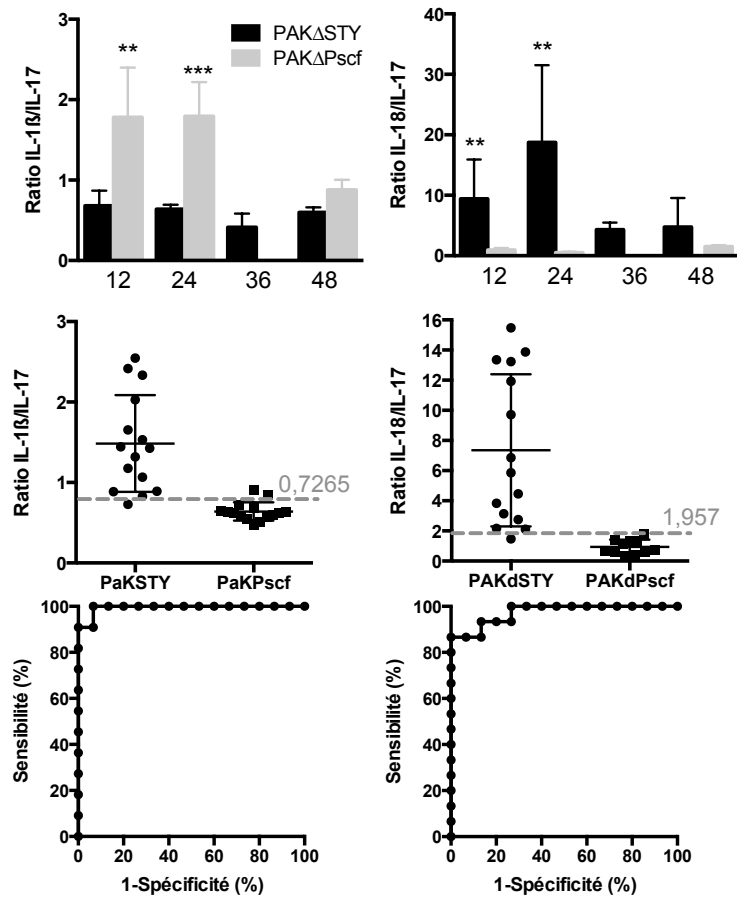
Figure 45 : Ratios IL-1 $\beta$ /IL-17 et IL-18/IL-17 pour différencier les souches T3SS+ (CHA) et T3SS- (CHA $\Delta$ popBD)

## 2) Évaluation des ratios avec la souche PAK

La souche CHA étant une souche mucoïde, nous avons réalisé la même expérience avec la souche PAK, une autre souche de laboratoire, non mucoïde. Afin de confirmer que les ratios sont corrélés à l'activité du SST3 indépendamment des exotoxines, nous avons utilisé la souche PAK $\Delta$ STY (T3SS+) délétée des exotoxines. Enfin la souche PAK $\Delta$ Pscf délétée de la protéine Pscf, protéine qui en se polymérisant forme l'aiguille du SST3, a été utilisée comme souche T3SS-.



**Figure 46 : Analyse cinétique de la réponse de l'hôte dans un modèle d'agression pulmonaire aiguë avec une souche T3SS+ (PAKΔSTY) et T3SS- (PAKΔPscf).** Les souris sont instillées avec la souche PAKΔSTY  $5.10^6$  UFC et PAKΔPscf  $5.10^7$  UFC et sacrifiées à 12, 24, 36 et 48 heures. Lésion pulmonaire (%). Dosage de l'IL-18, l'IL-1β, IL-17, le TNFα et KC dans les surnageants des LBA des souris par méthode ELISA (n=5 par groupe).



**Figure 47 : Ratios IL-1β/IL-17 et IL-18/IL-17 pour différencier les souches T3SS+ (PAKΔSTY) et T3SS- (PAKΔPscf)**

**Figure 47 : Ratios IL-1 $\beta$ /IL-17 et IL-18/IL-17 dans un modèle cinétique d'agression pulmonaire aiguë comparant les souches PAK et PAK $\Delta$ Pscf**

Des résultats similaires à ceux obtenus avec la souche CHA sont obtenus pour la lésion pulmonaire (Figure 46). Les ratios sont significatifs de la 12<sup>e</sup> à la 24<sup>e</sup> heure (Figure 47) et présentent les caractéristiques suivantes (cf tableau 15) :

<b>Ratio IL</b>	<b>Valeur</b>	<b>Sensibilité (IC 95%)</b>	<b>Spécificité (IC 95%)</b>	<b>R. de vraisemblance positif</b>
<b>IL-1<math>\beta</math>/17</b>	<b>1,957</b>	100 (71.51-100)	93,33 (68.05-99.83)	15
<b>IL-18/17</b>	<b>0,7265</b>	86,67 (59,54-98,34)	100 (78,20-100)	13

**Tableau 15 : Ratios obtenus dans un modèle cinétique d'agression pulmonaire aiguë avec la souche PAK**

En conclusion, les ratios IL-1 $\beta$ /IL-17 et IL-18/IL-17 permettent, dans notre modèle murin d'infection pulmonaire aiguë, de différencier une infection pulmonaire aiguë due à une souche T3SS+ d'une infection due à une souche T3SS-. Il s'agit donc d'une preuve de concept très préliminaire d'un biomarqueur de l'activité d'un facteur de virulence, le SST3 au cours de l'infection pulmonaire aiguë.



## Discussion :

### 1) *P. aeruginosa* détourne la réponse de l'hôte

La réponse innée joue un rôle clé immédiat dans le développement et l'organisation des défenses antibactériennes de l'hôte. Les bactéries ont donc développé des stratégies d'échappement(20) et l'inflammasome ne fait pas exception à cette règle. Parmi les stratégies étudiées chez les bactéries intracellulaires, *L. monocytogenes* et *S. Typhimurium* répriment l'expression de la flagelline et évitent ainsi la détection par le NLRC4-inflammasome(191). D'autres bactéries possèdent des exotoxines inhibant l'activation de l'inflammasome, c'est le cas de la protéine Zmp1 de *Mycobacterium tuberculosis* ou encore *Yersinia enterocolitica* grâce à son inhibiteur de la caspase-1, YopE(20).

Dans cette étude nous présentons non pas un mécanisme d'échappement à l'inflammasome mais au contraire son détournement par la bactérie au détriment de l'hôte. En effet, *P. aeruginosa*, par l'intermédiaire de son SST3, demeure extracellulaire(52), sécrète des exotoxines cytotoxiques(45) et active l'inflammasome(120). Plusieurs études ont rapporté que l'appareil du SST3 est cytotoxique en soit, indépendamment de la translocation des exotoxines(25,44,70). Dans cette étude, nous observons que *P. aeruginosa* active l'inflammasome grâce à un SST3 fonctionnel, également indépendamment de la présence des exotoxines. Ainsi l'activation du NLRC4-inflammasome pourrait être un des mécanismes par lequel le SST3 en lui même entraîne la perte de la cellule clé de l'immunité innée pulmonaire et majore l'inflammation dans les voies aériennes. Cette pyroptose permet, lors des infections par des intracellulaires, d'exposer un pathogène se camouflant et se répliquant dans le cytoplasme de la cellule hôte, alors qu'ici cette mort cellulaire augmente l'inflammation locale par relargage du contenu intracellulaire dans l'espace interstitiel sans éliminer le pathogène proliférant en extracellulaire.

En activant l'inflammasome par son SST3, *P. aeruginosa* active aussi la sécrétion d'IL-18 avec deux conséquences : d'une part nous avons montré qu'IL-18 réprime la répression la voie Th17 (IL-17 et IL-22), des peptides antimicrobiens et de la réparation épithéliale médiée par l'IL-22 et d'autre part, IL-18 augmente l'inflammation pulmonaire par un recrutement massif et excessif de polynucléaires neutrophiles dans les voies aériennes, augmentant la

lésion pulmonaire. Ces deux mécanismes contribuent à diminuer la clairance bactérienne et à diminuer la survie de l'hôte. *Pseudomonas aeruginosa* n'échappe donc pas à l'inflammasome en l'inhibant mais au contraire l'active, majorant les lésions induites par les défenses immunitaires. Nous mettons ainsi en évidence un nouveau mécanisme de virulence du pathogène qui détourne la réponse immune de l'hôte à son profit.

## 2) Rôle différentiel des « sensors » du flagelle : NLRC4 et TLR5

Les inflammasomes sont des plateformes de surveillance ou « sensors » de l'immunité innée, détectant des motifs très conservés de certains pathogènes envahissant le milieu intracellulaire. L'activation est nécessaire à la clairance des bactéries à réplication intracellulaire et pour la survie de l'hôte. Les exotoxines du SST3, particulièrement l'ExoT, diminuent l'internalisation de *P. aeruginosa*(192). Inversement, tout défaut de sécrétion d'exotoxines doit participer à l'augmentation de l'internalisation observée lorsque la souche ne possède pas un SST3 fonctionnel(52) (T3SS-). Ainsi les souches T3SS- se rapprochent des bactéries à réplication intracellulaire. NLRC4 et TLR5(82), deux PPRs respectivement intracellulaire et membranaire reconnaissent tous deux la flagelline des bactéries y compris celle de *P. aeruginosa*.

Nous observons ainsi que l'activation d'un récepteur membranaire comme TLR5 est nécessaire à la clairance des souches extracellulaires de *P. aeruginosa* possédant un SST3. En effet la clairance bactérienne était significativement diminuée chez les souris *Tlr5*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris *Wt*, due à une diminution de la sécrétion d'IL-17. Lorsque les souris étaient infectées avec une souche CHAΔFliC, aucune différence n'était alors observée. Enfin, aucune différence n'était observée entre les souris *Wt* et *Tlr5*<sup>-/-</sup> lorsque celles-ci étaient infectées avec une souche intracellulaire flagellée ou non. Ainsi TLR5 ne semble pas contribuer à la clairance des bactéries intracellulaires (T3SS-). A l'inverse, NLRC4, reconnaissant aussi le flagelle était nécessaire à la clairance des souches intracellulaires (T3SS-) et à la survie de l'hôte. NLRC4 et TLR5 reconnaissent donc le même motif de *P. aeruginosa* mais leur situation cytosolique et membranaire leur confère un rôle essentiel au cours des infections intracellulaires et extracellulaires respectivement.

Le rôle bénéfique de l'axe IL-23/IL-17 au cours les infections pulmonaires aiguës à *P. aeruginosa* a déjà été démontré(156-158), mais aucun mécanisme n'avait été élucidé. La

relevance chez l'humain de cette voie Th17 au cours les infections bactériennes pulmonaires peut être soulignée par une étude récente. En effet, la voie Th17 est impliquée dans la physiopathologie des maladies inflammatoires et auto-immunes : dans un essai clinique récent, des investigateurs ont utilisé un anticorps monoclonal humanisé anti-IL-17 (le brodalumab) pour traiter des patients atteints de Psoriasis (155). Outre l'efficacité intéressante de la thérapeutique, les investigateurs rapportaient une augmentation significative des infections respiratoires dues à des bactéries à Gram négatif dans le groupe recevant l'anticorps comparé au groupe placebo. Dans notre étude, nous montrons que l'activation de TLR5 est impliquée dans la réponse Th17 et que cette réponse conduit à l'expression de peptides antimicrobiens et au recrutement de cellules phagocytaires. De plus nous montrons que l'activation de NLRC4 réprime la voie Th17 par l'intermédiaire de l'IL-18, et conduit à la perte des macrophages alvéolaires par pyroptose augmentant ainsi l'inflammation dans les voies aériennes pulmonaires.

### **3) L'IL-18 est délétère mais l'IL-1 $\beta$ semble nécessaire à la clairance de *P. aeruginosa* au cours de l'infection pulmonaire aiguë**

Le rôle des différentes cytokines de l'inflammasome au cours de l'infection pulmonaire par *P. aeruginosa* a déjà été abordée. Tout d'abord, la sécrétion d'IL-18 a déjà été démontrée comme délétère. En effet, Schultz *et al* ont montré que les souris *IL-18*<sup>-/-</sup> survivaient mieux que les souris *Wt* dans un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa*(131,190). A l'inverse l'IL-1 $\beta$  était démontré comme nécessaire à la clairance de *P. aeruginosa* (193). Les auteurs soulignaient le rôle important de l'IL-1 $\beta$  dans l'initiation de la réponse d'hôte et le recrutement précoce de cellules phagocytaires. En plus de ces rôles et à la différence de l'IL-18, l'IL-1 $\beta$  joue aussi un rôle important dans l'initiation de la voie Th17(194). Enfin les souris *caspase-1*<sup>-/-</sup>, ne pouvant activer l'inflammasome, montraient une susceptibilité accrue à *P. aeruginosa*(127,129). Bien que co-sécrétées par les inflammasomes, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 semblent donc avoir deux rôles bien différents. L'antagonisation sélective de l'IL-18 semble donc la solution la plus intéressante dans ce contexte.

#### 4) L'immunomodulation de l'interaction délétère hôte-pathogène

L'augmentation des résistances bactériennes, l'absence de développement de nouveaux antibiotiques nécessitent de trouver de nouvelles stratégies de traitement. Comme nous l'avons vu dans cette étude, *P. aeruginosa* et ses facteurs de virulence ne sont qu'en partie responsables des lésions tissulaires observées. En effet, la réponse inflammatoire de l'hôte et les dégâts induits par les cellules phagocytaires, particulièrement les neutrophiles lorsque excessivement recrutés et activés, conduit à une lésion pulmonaire aiguë (ALI). Nous ne parlons plus de virulence de la bactérie mais d'une interaction hôte-pathogène délétère et déséquilibrée, médiée par une réponse exacerbée de l'hôte. Deux nouvelles stratégies thérapeutiques peuvent donc être élaborées. D'une part, désarmer la bactérie sans la tuer, la bactéricidie demeurant du ressort de l'antibiothérapie à laquelle les thérapeutiques adjuvantes sont destinées à s'adjoindre. C'est l'intérêt des anticorps anti-PcrV, inhibant la fonctionnalité du SST3 ou de l'azithromycine, inhibant le quorum sensing(195,196) tous deux en cours de développement. D'autre part, moduler les défenses de l'hôte afin de rééquilibrer une réponse innée adaptée. Nous avons ainsi testé successivement 3 composés, la polymyxine E (colistine), les anticorps anti-PKC $\delta$  et enfin la thérapeutique la plus ciblée, l'IL-18BP. La polymyxine E(126) et les anticorps anti-PKC $\delta$  vont empêcher la phosphorylation de NLRC4 par la PKC $\delta$  et diminuer l'activation du NLRC4-inflammasome(97). Cette inactivation entraîne la diminution de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18, permettant de rétablir en partie la voie Th17. Ainsi on retrouve une diminution de l'inflammation dans les voies aériennes et de la lésion pulmonaire induite mais le bénéfice sur la clairance bactérienne n'était pas significatif. En effet, la PKC $\delta$  est, outre son rôle dans la phosphorylation de NLRC4, également impliquée dans l'expression des peptides antimicrobiens(197,198) qui participent à la clairance bactérienne de la voie Th17. D'où une atténuation de l'efficacité des anticorps anti-PKC $\delta$ . Enfin l'antagonisation spécifique de l'IL-18 par son récepteur soluble, l'IL-18BP permet de réduire significativement l'inflammation des voies aériennes, lève le contrôle négatif exercé par l'IL-18 sur l'IL-17 et permet d'induire l'expression des peptides antimicrobiens. La clairance bactérienne et la survie des souris traitées par l'IL-18BP sont alors significativement augmentées. Nous soulignons ainsi le rôle majeur de l'inflammasome dans la lésion pulmonaire aiguë médiée par *P. aeruginosa*. De plus, du fait du coût important de l'IL-18BP recombinante, les doses utilisées dans nos expériences sont faibles et un effet encore plus bénéfique est attendu pour des doses plus importantes. Enfin, une équipe a récemment confirmé ce rôle de l'inflammasome et spécifiquement de l'IL-18 chez des patients atteints

d'une lésion aiguë pulmonaire médiée par une ventilation mécanique. En outre, les patients possédaient des taux d'IL-18 significativement augmentés dans les poumons et le sérum(180).

Le SST3 n'est donc pas qu'une simple seringue permettant la translocation d'exotoxines, mais est aussi un cheval de Troie, manipulant la réponse de l'hôte au profit de la bactérie(20). L'évolution des mécanismes adaptatifs bactériens est extrêmement rapide comparée à l'évolution des êtres humains et permet de prendre à défaut bon nombre de nos mécanismes de défenses. L'immunomodulation de l'hôte semble donc une stratégie thérapeutique prometteuse(199) et de nombreux peptides régulateurs de l'immunité innée sont ainsi en cours d'évaluation dans de nombreux essais cliniques(199).

### **5) La réponse de l'hôte comme biomarqueur dans l'indication des biothérapies ciblées**

Dans une étude clinique réalisée chez les patients atteints d'une PAVM à *P. aeruginosa*, la présence du SST3 en lui-même, indépendamment des exotoxines, est associée à une augmentation de la mortalité(51). Cette même étude montrait que le SST3 était présent chez seulement 77% des isolats cliniques de PAVM(51). Le développement de thérapeutiques inhibitrices du SST3 comme les anticorps anti-PcrV permet d'augmenter la survie des animaux dans des modèles de pneumonies aiguës(54) et de réduire la colonisation à *P. aeruginosa* des patients sous ventilation mécanique(55). Ces biothérapies sont donc efficaces mais posséderont sans doute un coût non négligeable et inadapté à la politique d'économie de santé actuelle en matière de traitement des maladies infectieuses et de prévention d'émergence de résistances aux antibiotiques. Affiner l'indication de tels traitements permettrait leur utilisation raisonnée en pratique clinique. La détection du gène *exsA* par PCR met en évidence la présence du gène de régulation du SST3 mais ne permet pas d'affirmer que le SST3 est bien exprimé et présent sur la membrane de la bactérie(70). De plus la mise en évidence du SST3 par l'utilisation d'anticorps marqué à un fluorochrome ne peut affirmer que celui-ci est fonctionnel et responsable de la symptomatologie observée chez le patient. Ne pas prendre en compte ces éléments viendrait à traiter par excès et inutilement de nombreux patients. Nous avons vu dans notre étude que lorsque le SST3 est fonctionnel, celui-ci active le NLRC4-inflammasome, induisant la sécrétion de l'IL-18 et de l'IL-1 $\beta$  et la répression de l'IL-17. A l'inverse, un SST3 non fonctionnel diminue la sécrétion d'IL-18 et augmente donc

la sécrétion d'IL-17. Nous avons donc ainsi évalué les ratios IL-1 $\beta$ /IL-17 et IL-18/IL-17 dans le but de distinguer l'infection médiée par des souches T3SS+ ou T3SS-, et donc possiblement de guider l'indication de thérapeutiques inhibitrices du SST3 (Exemple : anticorps anti-PcrV). Les résultats obtenus chez la souris étant encourageants, et ces cytokines étant aisément dosables dans les prélèvements pulmonaires des patients(200), une évaluation de ces ratios est actuellement en cours dans les prélèvements endotrachéaux de patients atteints de PAVM à *P. aeruginosa* documentées. La présence du SST3 sur chaque souche sera évaluée dans un second temps en fonction des ratios IL-1 $\beta$ /IL-17 obtenus pour chaque patient.

En conclusion, le pathogène et ses facteurs de virulence ne déterminent pas à eux seuls le pronostic de la maladie. En effet une réponse de l'hôte adaptée permet la clairance du micro-organisme et minimise les lésions tissulaires induites. Au contraire, une réponse insuffisante ou inadaptée assombrit le pronostic de l'hôte. Ainsi, les micro-organismes tels que *P. aeruginosa*, n'échappent plus à la réponse de l'hôte en se camouflant ou en l'évitant, mais la détournent pour majorer les dégâts tissulaires, favorisant ainsi leur dissémination. La réponse de l'hôte devient donc une cible de choix dans le futur arsenal thérapeutique et diagnostique dans le domaine des infections pulmonaires aiguës.

## Publications :

### 1) Articles Scientifiques

Faure E, Mear JB, Faure K, Normand S, Couturier A, Grandjean T, Balloy V, Dessein R, Chignard M, Uyttnehove C, Guery B, Gosset P, Chamaillard M, Kipnis E.  
*Pseudomonas aeruginosa* Type-3 secretion system dampens host defense by exploiting NLRC4 inflammasome.

**American Journal of respiratory and critical care medicine, 2013**

Mear JB, Kipnis E, Faure E, Dessein R, Schurtz G, Faure K, Guery B  
*Candida albicans and Pseudomonas aeruginosa interactions: More than an opportunistic criminal association?*

**Medecine et maladies infectieuses, mars 2013**

Mear JB, Gosset P, Kipnis E, Faure E, Dessein R, Fradin C, Faure K, Poulain D, Sendid B, Guery BP

*Candida albicans* airway exposure primes the lung innate immune response against *Pseudomonas aeruginosa* infection through innate lymphoid cell recruitment and IL-22 associated mucosal response

**Infection and Immunity, octobre 2013**

### 2) Communications orales congrès internationaux

Faure E, Mear JB, Faure K, Schurtz G, Chamaillard M, Gosset P, Guery BP, Kipnis E.  
IPAF-inflammasome null Mice are protected from *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute Lung Infection.

ICAAC 2012 ; San Francisco, 2012, 7 au 12 Septembre. [Poster B-060]

Award: American society of microbiology (ASM) and ICAAC committee award in the area of *Immunology of Infection*.

Anantharajah A, Faure E, Buyck J, Sundin C, Lindmark T, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP, Guery B and Van Bambeke F.

The 8-hydroxyquinoline INP1855 reduces Type Three Secretion System (T3SS)-dependent virulence of *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.) *in vitro* and *in vivo*

14<sup>th</sup> International Conference on Pseudomonas, Lausanne, 2013, 7 au 11 Septembre.

Anantharajah A., Faure E., Buyck J.M., Tulkens P.M., Mingeot-Leclercq M.P., Guery B. and Van Bambeke F.

Type Three Secretion System (T3SS)-mediated cytotoxicity and internalization of *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.) by epithelial and phagocytic cells: does inflammasome activation make the difference?

14<sup>th</sup> International Conference on Pseudomonas, Lausanne, 2013, 7 au 11 Septembre.

Faure E, Bortolotti P, Clapies A, Lachâtre M, Martinez L, Mear JB, Dessen R, Guery BP, Faure K, Kipnis E.  
Immunosuppressive IL-18 Binding Protein (IL-18BP) therapy: a new target in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung infection. [Poster B-060]  
ICAAC 2013 ; Denver, 2013, 10 au 13 Septembre.

### 3) Communications orales congrès nationaux

Faure E, Mear JB, Faure K, Schurtz G, Chamaillard M, Guery BP, Kipnis E.  
Influence of virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa* on mucosal immunity.  
Groupe de recherche *Pseudomonas aeruginosa* ; Paris, 2011, 10 et 11 septembre.

Faure E, Mear JB, Faure K, Chamaillard M, Gosset P, Guery BP, Kipnis E.  
*Pseudomonas aeruginosa* détourne le NLRC4-inflammasome.  
Journée de recherche respiratoire de Lille ; Lille, 2012, 10 septembre.

Faure E, Mear JB, Faure K, Schurtz G, Chamaillard M, Gosset P, Guery BP, Kipnis E.  
How *Pseudomonas aeruginosa* exploits NLRC4-Inflammasome.  
Groupe de recherche *Pseudomonas aeruginosa* ; Grenoble, Autrans, 2012, 12 et 13 octobre.

Faure E, Mear JB, Faure K, Chamaillard M, Gosset P, Guery BP, Kipnis E.  
Relation hôte-Pathogène : Intérêt du détournement de l'inflammasome par *Pseudomonas aeruginosa*  
*InfectioNord* ; Saint-Valéry, 2013, 3 et 4 février.

Faure E, Mear JB, Bortolotti P, Faure K, Guery BP, Gosset P, Dessen R, Chamaillard M, Kipnis E.  
How *Pseudomonas aeruginosa* exploits NLRC4-Inflammasome.  
Journées André Verbert, Lille, 2013, 18 septembre

Faure E, Bortolotti P, Clapies A, Faure K, Guery BP, Dessen R, Kipnis E.  
New Therapeutics to target inflammasome during *P. aeruginosa* acute lung infection  
Groupe de recherche *Pseudomonas aeruginosa* ; Loulans 2013, 11 et 12 octobre.



## Bibliographie :

1. Schwarzer C, Fu Z, Patanwala M, Hum L, Lopez-Guzman M, Illek B, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated homoserine lactone C12 rapidly activates apoptosis in airway epithelia. *Cell Microbiol.* 2012 May;14(5):698–709.
2. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Micro.* 2009 Nov 30;8(1):15–25.
3. Schweizer HP, Choi K-H. *Pseudomonas aeruginosa* aerobic fatty acid desaturase DesB is important for virulence factor production. *Arch Microbiol.* 2011 Mar;193(3):227–34.
4. Kamei A, Koh AY, Gadjeva M, Priebe GP, Lory S, Pier GB. Analysis of acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* gastrointestinal mucosal colonization and horizontal transmission in a murine model. *J Infect Dis.* 2010 Jan 1;201(1):71–80.
5. Auboyer C. [*Pseudomonas aeruginosa*: from colonisation to infection]. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2003 Jun;22(6):531–3.
6. Wong A, Rodrigue N, Kassen R. Genomics of adaptation during experimental evolution of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet.* 2012 Sep;8(9):e1002928.
7. Bajmoczy M, Gadjeva M, Alper SL, Pier GB, Golan DE. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and caveolin-1 regulate epithelial cell internalization of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol, Cell Physiol.* 2009 Aug;297(2):C263–77.
8. Hauser AR. Ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*: cap your needles! *Critical Care Medicine.* 2012 Aug;40(8):2503–4.
9. Chastre J, Fagon J-Y. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Apr 1;165(7):867–903.
10. Solh El AA, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2009 Aug;64(2):229–38.
11. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jan;50(1):43–8.
12. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microb Ecol.* Springer US; 2013 Oct 6;:1–12.
13. Huang X. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Corneal Infection Using an Oligonucleotide Microarray. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2003 Aug 1;44(8):3409–16.
14. Kelsey M. *Pseudomonas* in augmented care: should we worry? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* Oxford University Press; 2013 Jul 17;:dkt288.

15. Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS; 2011 Dec 1;13(14-15):1133–45.
16. Netea MG, van de Veerdonk FL, van Deuren M, van der Meer JW. Defects of pattern recognition: primary immunodeficiencies of the innate immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 2011 Apr 15.
17. Koh AY, Priebe GP, Pier GB. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of gastrointestinal colonization and dissemination in neutropenia. *Infect Immun*. 2005 Apr 1;73(4):2262–72.
18. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Micro*. 2009 Sep;7(9):654–65.
19. Ader F, Le Berre R, Faure K, Gosset P, Epaulard O, Toussaint B, et al. Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. *Infect Immun*. 2005 Jul;73(7):4263–71.
20. Diacovich L, Gorvel J-P. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Micro*. 2010 Feb;8(2):117–28.
21. Faure K, Leberre R, Guery BP. [*Pseudomonas aeruginosa* and Surfactant-associated Proteins A and D]. *Med Mal Infect*. 2006 Feb;36(2):63–71.
22. Cigana C, Lorè NI, Bernardini ML, Bragonzi A. Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;2011:1–10.
23. Huddleston JE. Contact killing by *Pseudomonas*. *Nat Rev Micro*. 2011 Sep;9(9):632.
24. Worrall LJ, Lameignere E, Strynadka NCJ. Structural overview of the bacterial injectisome. *Curr Opin Microbiol*. 2011 Feb;14(1):3–8.
25. Lee VT, Smith RS, Tümmler B, Lory S. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun*. 2005 Mar;73(3):1695–705.
26. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GPF, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol*. 2010 Dec;300(8):534–43.
27. Rüssmann H, Shams H, Poblete F, Fu Y, Galán JE, Donis RO. Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science*. 1998 Jul 24;281(5376):565–8.
28. Wagner JM, Evans TJ, Chen J, Zhu H, Houben ENG, Bitter W, et al. Understanding specificity of the mycosin proteases in ESX/type VII secretion by structural and functional analysis. *J Struct Biol*. 2013 Oct 7.
29. Jyot J, Balloy V, Jouvion G, Verma A, Touqui L, Huerre M, et al. Type II Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: In Vivo Evidence of a Significant Role in Death

- Due to Lung Infection. *J Infect Dis*. 2011 Apr 15;203(10):1369–77.
30. Pierre M, Le Berre R, Tiesset H, Faure K, Guery BP, Desseyn J-L, et al. [Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* virulence gene expression during chronic lung infection in the murine model]. *Med Mal Infect*. 2008 Jun;38(6):318–23.
  31. Salacha R, Kovacic F, Brochier-Armanet C, Wilhelm S, Tommassen J, Filloux A, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ Microbiol*. Blackwell Publishing Ltd; 2010 Jun;12(6):1498–512.
  32. Russell AB, Hood RD, Bui NK, LeRoux M, Vollmer W, Mougous JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*. Nature Publishing Group; 2011 Jul 11;475(7356):343–7.
  33. Jin Y, Yang H, Qiao M, Jin S. MexT regulates the type III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2011 Jan;193(2):399–410.
  34. Galán JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*. 2006 Nov 30;444(7119):567–73.
  35. Loquet A, Sgourakis NG, Gupta R, Giller K, Riedel D, Goosmann C, et al. Atomic model of the type III secretion system needle. *Nature*. 2012 Jun 14;486(7402):276–9.
  36. Sun Y, Karmakar M, Taylor PR, Rietsch A, Pearlman E. ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *The Journal of Immunology*. 2012 Feb 15;188(4):1884–95.
  37. Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Nov 10;95(23):13899–904.
  38. Howell HA, Logan LK, Hauser AR. Type III Secretion of ExoU Is Critical during Early *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *mBio*. 2013;4(2).
  39. Dacheux D, Attree I, Toussaint B. Expression of ExsA in trans confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Infect Immun*. 2001 Jan;69(1):538–42.
  40. Brutinel ED, Vakulskas CA, Yahr TL. ExsD inhibits expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by disrupting ExsA self-association and DNA binding activity. *J Bacteriol*. 2010 Mar;192(6):1479–86.
  41. Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 May 31;102(22):8006–11.
  42. Izoré T, Job V, Dessen A. Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure*. 2011 May 11;19(5):603–12.
  43. Tampakaki AP, Fadouloglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ, Kokkinidis M.

- Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.* 2004 Sep;6(9):805–16.
44. Dacheux D, Goure J, Chabert J, Usson Y, Attree I. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol.* 2001 Apr;40(1):76–85.
  45. Verove J, Bernarde C, Bohn Y-ST, Boulay F, Rabiet M-J, Attree I, et al. Injection of *Pseudomonas aeruginosa* Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity. *PLoS ONE.* 2012;7(1):e30488.
  46. Goure J, Pastor A, Faudry E, Chabert J, Dessen A, Attree I. The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun.* 2004 Aug;72(8):4741–50.
  47. Rabin SDP, Hauser AR. Functional regions of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU. *Infect Immun.* 2005 Jan;73(1):573–82.
  48. Shen D-K, Quénee L, Bonnet M, Kuhn L, Derouazi M, Lamotte D, et al. Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed Environ Sci.* 2008 Apr;21(2):103–9.
  49. Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun.* 2004 Dec;72(12):6969–77.
  50. Hritonenko V, Mun JJ, Tam C, Simon NC, Barbieri JT, Evans DJ, et al. Adenylate cyclase activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoY can mediate bleb-niche formation in epithelial cells and contributes to virulence. *Microb Pathog.* 2011 Nov;51(5):305–12.
  51. Hauser AR, Cobb E, Bodi M, Mariscal D, Vallés J, Engel JN, et al. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Care Medicine.* 2002 Mar;30(3):521–8.
  52. Sawa T, Yahr TL, Ohara M, Kurahashi K, Gropper MA, Wiener-Kronish JP, et al. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nature Medicine.* 1999 Apr;5(4):392–8.
  53. Shime N, Sawa T, Fujimoto J, Faure K, Allmond LR, Karaca T, et al. Therapeutic administration of anti-PcrV F(ab')(2) in sepsis associated with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol.* 2001 Nov 15;167(10):5880–6.
  54. Faure K, Fujimoto J, Shimabukuro DW, Ajayi T, Shime N, Moriyama K, et al. Effects of monoclonal anti-PcrV antibody on *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury in a rat model. *J Immune Based Ther Vaccines.* 2003 Aug 13;1(1):2.
  55. François B, Luyt C-E, Dugard A, Wolff M, Diehl J-L, Jaber S, et al. Safety and pharmacokinetics of an anti-PcrV PEGylated monoclonal antibody fragment in mechanically ventilated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Critical Care Medicine.* 2012 Aug;40(8):2320–6.

56. Dasgupta N, Wolfgang MC, Goodman AL, Arora SK, Jyot J, Lory S, et al. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 2003 Nov;50(3):809–24.
57. Inaba S, Hashimoto M, Jyot J, Aizawa S-I. Exchangeability of the flagellin (FliC) and the cap protein (FliD) among different species in flagellar assembly. *Biopolymers*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2013 Jan;99(1):63–72.
58. Verma A, Arora SK, Kuravi SK, Ramphal R. Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):8237–46.
59. Prince A. Flagellar activation of epithelial signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 May;34(5):548–51.
60. Ben Mohamed F, Mohamed FB, Garcia-Verdugo I, Medina M, Balloy V, Chignard M, et al. A crucial role of Flagellin in the induction of airway mucus production by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e39888.
61. Ramphal R, Balloy V, Jyot J, Verma A, Si-Tahar M, Chignard M. Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *J Immunol*. 2008 Jul 1;181(1):586–92.
62. Balloy V, Verma A, Kuravi S, Si-Tahar M, Chignard M, Ramphal R. The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis*. Oxford University Press; 2007 Jul 15;196(2):289–96.
63. Arlehamn CSL, Evans TJ. *Pseudomonas aeruginosa* pilin activates the inflammasome. *Cell Microbiol*. 2011 Mar;13(3):388–401.
64. Wang S, Parsek MR, Wozniak DJ, Ma LZ. A spider web strategy of type IV pili-mediated migration to build a fibre-like Psl polysaccharide matrix in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol*. 2013 Aug;15(8):2238–53.
65. Kanthakumar K, Taylor G, Tsang KW, Cundell DR, Rutman A, Smith S, et al. Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat in vitro. *Infect Immun*. 1993 Jul;61(7):2848–53.
66. Hogan DA, Vik A, Kolter R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol*. 2004 Dec;54(5):1212–23.
67. Yeterian E, Martin LW, Guillon L, Journet L, Lamont IL, Schalk IJ. Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids*. 2010 May;38(5):1447–59.
68. Imperi F, Tiburzi F, Visca P. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Dec 1;106(48):20440–5.
69. Toussaint B, Delic-Attree I, Vignais PM. *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Oct 15;196(1):416–21.

70. Dacheux D, Epaulard O, de Groot A, GUERY B, Leberre R, Attree I, et al. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system requires an intact pyruvate dehydrogenase aceAB operon. *Infect Immun*. 2002 Jul;70(7):3973–7.
71. Wölbeling F, Munder A, Kerber-Momot T, Neumann D, Hennig C, Hansen G, et al. Lung function and inflammation during murine *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Immunobiology*. 2011 Aug;216(8):901–8.
72. Eddens T, Kolls JK. Host defenses against bacterial lower respiratory tract infection. *Curr Opin Immunol*. 2012 Jul 25.
73. Martin TR. Innate Immunity in the Lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005 Dec 1;2(5):403–11.
74. Cavaillon JM. La réponse immunitaire à l'agression: le B.A.-BA — Système immunitaire inné. *Réanimation*. 2010 Dec 29;20(S2):393–405.
75. Misharin AV, Scott Budinger GR, Perlman H. The lung macrophage: a Jack of all trades. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Sep 1;184(5):497–8.
76. Tsai KS, Grayson MH. Pulmonary defense mechanisms against pneumonia and sepsis. *Curr Opin Pulm Med*. 2008 May;14(3):260–5.
77. Pembroke TPI, Gallimore AM, Godkin A. Rapid innate control of antigen abrogates adaptive immunity. *Immunology*. 2013 Apr;138(4):293–7.
78. Moldoveanu B, Otmishi P, Jani P, Walker J, Sarmiento X, Guardiola J, et al. Inflammatory mechanisms in the lung. *J Inflamm Res*. 2009;2:1–11.
79. Blander JM, Sander LE. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol*. 2012 Mar;12(3):215–25.
80. Kufer TA, Sansonetti PJ. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol*. 2011 Feb;12(2):121–8.
81. Tsay T-B, Chang C-J, Chen P-H, Hsu C-M, Chen L-W. Nod2 mutation enhances NF- $\kappa$ B activity and bacterial killing activity of macrophages. *Inflammation*. 2009 Dec;32(6):372–8.
82. Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, Aderem A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol*. 2007 Sep;29(3):275–88.
83. Vijay-Kumar M, Carvalho FA, Aitken JD, Fifadara NH, Gewirtz AT. TLR5 or NLRC4 is necessary and sufficient for promotion of humoral immunity by flagellin. *Eur J Immunol*. 2010 Dec;40(12):3528–34.
84. Vladimer GI, Marty-Roix R, Ghosh S, Weng D, Lien E. Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. *Curr Opin Microbiol*. 2013 Jan 11.
85. Lamkanfi M, Kanneganti T-D, Franchi L, Núñez G. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007 Aug;82(2):220–5.

86. Sansonetti PJ, Phalipon A, Arondel J, Thirumalai K, Banerjee S, Akira S, et al. Caspase-1 activation of IL-1 $\beta$  and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation. *Immunity*. 2000 May;12(5):581–90.
87. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol*. 2010 Dec;11(12):1136–42.
88. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Micro*. 2009 Feb;7(2):99–109.
89. Brodsky IE, Medzhitov R. Pyroptosis: macrophage suicide exposes hidden invaders. *Curr Biol*. 2011 Jan 25;21(2):R72–5.
90. Damm A, Lautz K, Kufer TA. NLRP10 roles in innate and adaptive immunity. *Microbes Infect*. 2013 Apr 4.
91. Warren SE, Armstrong A, Hamilton MK, Mao DP, Leaf IA, Miao EA, et al. Cutting edge: Cytosolic bacterial DNA activates the inflammasome via Aim2. *The Journal of Immunology*. 2010 Jul 15;185(2):818–21.
92. Gomes MTR, Campos PC, Oliveira FS, Corsetti PP, Bortoluci KR, Cunha LD, et al. Critical Role of ASC Inflammasomes and Bacterial Type IV Secretion System in Caspase-1 Activation and Host Innate Resistance to *Brucella abortus* Infection. *The Journal of Immunology*. 2013 Apr 1;190(7):3629–38.
93. Sugawara Y, Uehara A, Fujimoto Y, Kusumoto S, Fukase K, Shibata K, et al. Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *J Dent Res*. 2006 Jun;85(6):524–9.
94. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev*. 2011 Sep;243(1):206–14.
95. Bergsbaken T, Fink SL, Hartigh den AB, Loomis WP, Cookson BT. Coordinated Host Responses during Pyroptosis: Caspase-1-Dependent Lysosome Exocytosis and Inflammatory Cytokine Maturation. *The Journal of Immunology*. 2011 Sep 1;187(5):2748–54.
96. Bliska JB, Casadevall A. Intracellular pathogenic bacteria and fungi--a case of convergent evolution? *Nat Rev Micro*. 2009 Feb;7(2):165–71.
97. Qu Y, Misaghi S, Izrael-Tomasevic A, Newton K, Gilmour LL, Lamkanfi M, et al. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Nature*. 2012 Oct 25;490(7421):539–42.
98. Bortoluci KR, Medzhitov R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell Mol Life Sci*. 2010 May;67(10):1643–51.
99. Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 $\beta$  via Ipaf. *Nat Immunol*. 2006 Apr 30;7(6):569–75.

100. Vinzing M, Eitel J, Lippmann J, Hocke AC, Zahlten J, Slevogt H, et al. NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. *J Immunol*. 2008 May 15;180(10):6808–15.
101. Sauer J-D, Pereyre S, Archer KA, Burke TP, Hanson B, Lauer P, et al. *Listeria monocytogenes* engineered to activate the Nlr4 inflammasome are severely attenuated and are poor inducers of protective immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Jul 11.
102. Henry T, Monack DM. Activation of the inflammasome upon *Francisella tularensis* infection: interplay of innate immune pathways and virulence factors. *Cell Microbiol*. 2007 Nov;9(11):2543–51.
103. Brodsky IE, Palm NW, Sadanand S, Ryndak MB, Sutterwala FS, Flavell RA, et al. A *Yersinia* effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. *Cell Host Microbe*. 2010 May 20;7(5):376–87.
104. Ceballos-Olvera I, Sahoo M, Miller MA, Del Barrio L, Re F. Inflammasome-dependent Pyroptosis and IL-18 Protect against *Burkholderia pseudomallei* Lung Infection while IL-1 $\beta$  Is Deleterious. *PLoS Pathog*. 2011 Dec;7(12):e1002452.
105. Di Santo JP. An IL-1 $\beta$ -dependent switch in innate mucosal immunity? *Immunity*. 2010 Jun 25;32(6):734–6.
106. Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulon N, Charron S, Schnyder-Candrian S, et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2007 Dec;117(12):3786–99.
107. Neighbors M, Xu X, Barrat FJ, Ruuls SR, Churakova T, Debets R, et al. A critical role for interleukin 18 in primary and memory effector responses to *Listeria monocytogenes* that extends beyond its effects on Interferon gamma production. *J Exp Med*. 2001 Aug 6;194(3):343–54.
108. Barker BR, Taxman DJ, Ting JP-Y. Cross-regulation between the IL-1 $\beta$ /IL-18 processing inflammasome and other inflammatory cytokines. *Curr Opin Immunol*. 2011 Oct;23(5):591–7.
109. Kanneganti T-D, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):549–59.
110. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*. 2010 Mar;10(3):210–5.
111. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006 Mar 9;440(7081):237–41.
112. Vanderschueren S, Knockaert D. Canakinumab in Schnitzler Syndrome. *Semin Arthritis Rheum*. 2012 Aug 14.
113. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid-induced



- NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol.* 2011 May;12(5):408–15.
114. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006 Mar 9;440(7081):228–32.
  115. Hu Z, Yan C, Liu P, Huang Z, Ma R, Zhang C, et al. Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science.* 2013 Jul 12;341(6142):172–5.
  116. Sutterwala FS, Flavell RA. NLRC4/IPAF: a CARD carrying member of the NLR family. *Clinical Immunology.* Elsevier Inc; 2009 Jan 1;130(1):2–6.
  117. Perez-Lopez A, Rosales-Reyes R, Alpuche-Aranda CM, Ortiz-Navarrete V. Salmonella Downregulates Nod-like Receptor Family CARD Domain Containing Protein 4 Expression To Promote Its Survival in B Cells by Preventing Inflammasome Activation and Cell Death. *The Journal of Immunology.* 2013 Jan 2.
  118. Pereira MSF, Morgantetti GF, Massis LM, Horta CV, Hori JI, Zamboni DS. Activation of NLRC4 by Flagellated Bacteria Triggers Caspase-1-Dependent and -Independent Responses To Restrict Legionella pneumophila Replication in Macrophages and In Vivo. *The Journal of Immunology.* 2011 Dec 15;187(12):6447–55.
  119. Cai S, Batra S, Wakamatsu N, Pacher P, Jeyaseelan S. NLRC4 Inflammasome-Mediated Production of IL-1 $\beta$  Modulates Mucosal Immunity in the Lung against Gram-Negative Bacterial Infection. *The Journal of Immunology.* 2012 Jun 1;188(11):5623–35.
  120. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Feb 16;107(7):3076–80.
  121. Lightfield KL, Persson J, Brubaker SW, Witte CE, Moltke von J, Dunipace EA, et al. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol.* 2008 Aug 24;9(10):1171–8.
  122. Wei H-L, Chakravarthy S, Worley JN, Collmer A. Consequences of flagellin export through the type III secretion system of *Pseudomonas syringae* reveal a major difference in the innate immune systems of mammals and the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Cell Microbiol.* 2012 Oct 29.
  123. Abdelaziz DH, Amr K, Amer AO. Nlrc4/Ipaf/CLAN/CARD12: more than a flagellin sensor. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Jun;42(6):789–91.
  124. Halff EF, Diebolder CA, Versteeg M, Schouten A, Brondijk THC, Huizinga EG. Formation and structure of a NAIP5-NLRC4 inflammasome induced by direct interactions with conserved N- and C-terminal regions of flagellin. *Journal of Biological Chemistry.* 2012 Nov 9;287(46):38460–72.
  125. Kofoed EM, Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature.* Nature Publishing Group; 2011 Aug

- 28;:1–6.
126. Mondrinos MJ, Kennedy PA, Lyons M, Deutschman CS, Kilpatrick LE. Protein Kinase C and Acute Respiratory Distress Syndrome. *Shock*. 2013 Apr;:1.
  127. Sutterwala FS, Mijares LA, Li L, Ogura Y, Kazmierczak BI, Flavell RA. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med*. 2007 Dec 17;204(13):3235–45.
  128. Miao EA, Ernst RK, Dors M, Mao DP, Aderem A. *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Feb 19;105(7):2562–7.
  129. Franchi L, Stoolman J, Kanneganti T-D, Verma A, Ramphal R, Núñez G. Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *Eur J Immunol*. 2007 Nov;37(11):3030–9.
  130. Karmakar M, Sun Y, Hise AG, Rietsch A, Pearlman E. Cutting edge: IL-1 $\beta$  processing during *Pseudomonas aeruginosa* infection is mediated by neutrophil serine proteases and is independent of NLRC4 and caspase-1. *The Journal of Immunology*. 2012 Nov 1;189(9):4231–5.
  131. Schultz MJ, Knapp S, Florquin S, Pater J, Takeda K, Akira S, et al. Interleukin-18 impairs the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 2003 Apr;71(4):1630–4.
  132. Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:160–71.
  133. Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2010 Dec;21(6):413–23.
  134. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol*. 2007 Dec;19(6):377–82.
  135. Nishida A, Lau CW, Zhang M, Andoh A, Shi HN, Mizoguchi E, et al. The membrane-bound mucin Muc1 regulates T helper 17-cell responses and colitis in mice. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):865–874.e2.
  136. Pan H-F, Li X-P, Zheng SG, Ye D-Q. Emerging role of interleukin-22 in autoimmune diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2013 Feb;24(1):51–7.
  137. Henry T, Kirimanjeswara GS, Ruby T, Jones JW, Peng K, Perret M, et al. Type I IFN signaling constrains IL-17A/F secretion by  $\gamma\delta$  T cells during bacterial infections. *The Journal of Immunology*. 2010 Apr 1;184(7):3755–67.
  138. Middendorp S, Nieuwenhuis EES. NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunology*. 2009 Sep;2(5):393–402.
  139. Walker JA, McKenzie A. Innate lymphoid cells in the airways. *Eur J Immunol*. 2012 Jun 8;42(6):1368–74.

140. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2010 Oct;21(5):315–24.
141. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol*. 2011 Mar;23(3):159–63.
142. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine*. 2008 Mar;14(3):275–81.
143. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol*. 2011 May;12(5):383–90.
144. Hansson M, Silverpil E, Lindén A, Glader P. Interleukin-22 produced by alveolar macrophages during activation of the innate immune response. *Inflamm Res*. 2013 Jun;62(6):561–9.
145. Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006 Oct 2;203(10):2271–9.
146. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med*. 2005 Sep 19;202(6):761–9.
147. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. 2009 Apr 17;30(4):576–87.
148. Traves SL, Donnelly LE. Th17 cells in airway diseases. *Curr Mol Med*. 2008 Aug;8(5):416–26.
149. Kappes DJ. Developing intestinal fortitude. *Nat Immunol*. 2011 Apr;12(4):281–2.
150. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2010 Jun 11;10(7):467–78.
151. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):503–10.
152. Barin JG, Baldeviano GC, Talor MV, Wu L, Ong S, Quader F, et al. Macrophages participate in IL-17-mediated inflammation. *Eur J Immunol*. 2012 Mar;42(3):726–36.
153. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature*. 2012 Apr 26;484(7395):514–8.
154. Ivanov S, Renneson J, Fontaine J, Barthelemy A, Paget C, Fernandez EM, et al. Interleukin-22 Reduces Lung Inflammation during Influenza A Virus Infection and

- Protects against Secondary Bacterial Infection. *J Virol*. 2013 Jun;87(12):6911–24.
155. Kumar P, Chen K, Kolls JK. Th17 cell based vaccines in mucosal immunity. *Curr Opin Immunol*. 2013 Jun;25(3):373–80.
156. 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 Feb;292(2):L519–28.
157. Dubin PJ, Martz A, Eisenstatt JR, Fox MD, Logar A, Kolls JK. Interleukin-23-mediated inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun*. 2012 Jan;80(1):398–409.
158. Liu J, Feng Y, Yang K, Li Q, Ye L, Han L, et al. Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Mar;61(2):179–88.
159. Wu W, Huang J, Duan B, Traficante DC, Hong H, Risech M, et al. Th17-stimulating Protein Vaccines confer Protection against *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Jun 21.
160. Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Micro*. 2009 May;7(5):355–66.
161. Doss M, White MR, Teclé T, Hartshorn KL. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J Leukoc Biol*. 2010 Jan;87(1):79–92.
162. Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate Immun*. 2010 Jun;16(3):151–9.
163. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Micro*. 2011 May;9(5):356–68.
164. Salzman NH. Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes*. 2010 Oct;1(6):401–6.
165. Kolls JK, McCray PB, Chan YR. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol*. 2008 Nov;8(11):829–35.
166. Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology*. Elsevier Inc; 2010 Apr 1;135(1):1–11.
167. Moranta D, Regueiro V, March C, Llobet E, Margareto J, Larrarte E, et al. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. *Infect Immun*. 2010 Mar;78(3):1135–46.
168. Scharf S, Zahlten J, Szymanski K, Hippenstiel S, Suttorp N, N'Guessan PD. *Streptococcus pneumoniae* induces human  $\beta$ -defensin-2 and -3 in human lung epithelium. *Exp Lung Res*. 2012 Mar;38(2):100–10.
169. Korgaonkar AK, Whiteley M. *Pseudomonas aeruginosa* Enhances Production of an

- Antimicrobial in Response to N-Acetylglucosamine and Peptidoglycan. *J Bacteriol.* 2011 Jan 26;193(4):909–17.
170. Casadevall A, Pirofski L-A. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Micro.* 2003 Oct;1(1):17–24.
171. Maeda M, Ozaki T, Yasuoka S, Ogura T. [Role of alveolar macrophages and neutrophils in the defense system against infection of *Pseudomonas aeruginosa* in the respiratory tract and the effect of derivative of muramyl dipeptide]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* 1990 Jan;28(1):135–42.
172. Cinel I, Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Critical Care Medicine.* 2009 Jan;37(1):291–304.
173. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest.* 2012 Aug 1;122(8):2731–40.
174. Bhattacharya J, Matthay MA. Regulation and Repair of the Alveolar-Capillary Barrier in Acute Lung Injury. *Annu Rev Physiol.* 2013 Feb 10;75(1):593–615.
175. Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:147–63.
176. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine.* 2011;17(11):1381–90.
177. Bdeir K, Higazi AA-R, Kulikovskaya I, Christofidou-Solomidou M, Vinogradov SA, Allen TC, et al. Neutrophil alpha-defensins cause lung injury by disrupting the capillary-epithelial barrier. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 May 1;181(9):935–46.
178. Corbett M, Kraehenbuhl J-P. Lung immunity: necessity is the mother of induction. *Nature Medicine.* 2004 Sep;10(9):904–5.
179. Singh NRP, Johnson A, Peters AM, Babar J, Chilvers ER, Summers C. Acute lung injury results from failure of neutrophil de-priming: a new hypothesis. *European Journal of Clinical Investigation.* 2012 Sep 18;42(12):1342–9.
180. Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, Hunninghake GM, An CH, Fredenburgh L, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Jun 1;185(11):1225–34.
181. Santos dos CC. The role of the inflammasome in ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Jun 1;185(11):1141–4.
182. Santos dos G, Kutuzov MA, Ridge KM. The inflammasome in lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012 Oct 15;303(8):L627–33.
183. Hendrickson EL, Plotnikova J, Mahajan-Miklos S, Rahme LG, Ausubel FM. Differential roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 rpoN gene in pathogenicity in plants, nematodes, insects, and mice. *J Bacteriol. American Society for Microbiology;* 2001 Dec;183(24):7126–34.

184. Chemani C, Imberty A, de Bentzmann S, Pierre M, Wimmerová M, Guery BP, et al. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun*. 2009 May;77(5):2065–75.
185. Lesic B, Rahme LG. Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Mol Biol*. 2008;9:20.
186. 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. *Infect Immun*. 2000 May;68(5):2916–24.
187. Quénée L, Lamotte D, Polack B. Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques*. 2005 Jan;38(1):63–7.
188. Boutoille D, Marechal X, Pichenot M, Chemani C, Guery BP, Faure K. FITC-albumin as a marker for assessment of endothelial permeability in mice: comparison with 125I-albumin. *Exp Lung Res*. 2009 May;35(4):263–71.
189. Buyck JM, Tulkens PM, Van Bambeke F. Pharmacodynamic Evaluation of the Intracellular Activity of Antibiotics towards *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a Model of THP-1 Human Monocytes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr 11;57(5):2310–8.
190. Cohen TS, Prince AS. Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest*. 2013 Mar 8.
191. Lamkanfi M, Dixit VM. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe*. 2010 Jul 22;8(1):44–54.
192. Garrity-Ryan L, Kazmierczak B, Kowal R, Comolli J, Hauser A, Engel JN. The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. *Infect Immun*. 2000 Dec;68(12):7100–13.
193. Schultz MJ, Rijneveld AW, Florquin S, Edwards CK, Dinarello CA, van der Poll T. Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Feb;282(2):L285–90.
194. Dungan LS, Mills KHG. Caspase-1-processed IL-1 family cytokines play a vital role in driving innate IL-17. *Cytokine*. 2011 Oct;56(1):126–32.
195. Tsai WC, Hershenson MB, Zhou Y, Sajjan U. Azithromycin increases survival and reduces lung inflammation in cystic fibrosis mice. *Inflamm Res*. 2009 Aug;58(8):491–501.
196. Høiby N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Med*. 2011;9:32.
197. Labed SA, Omi S, Gut M, Ewbank JJ, Pujol N. The pseudokinase NIPI-4 is a novel

- regulator of antimicrobial peptide gene expression. PLoS ONE. 2012;7(3):e33887.
198. Nakabayashi H, Brown JH, Morell JL, Chen HC, Huang KP. Phosphorylation of magainin-2 by protein kinase C and inhibition of protein kinase C isozymes by a synthetic analogue of magainin-2-amide. FEBS Lett. 1990 Jul 2;267(1):135–8.
  199. Hancock REW, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. Nat Rev Micro. 2012;10(4):243–54.
  200. De Luca A, Rindi L, Celi A, Melosini L, Paggiaro P, Nelli LC, et al. Intracellular detection of interleukin 17 and other cytokines in human bronchoalveolar lavage fluid: a first assessment. Immunol Lett. 2012 Jan 30;141(2):204–9.





## Résumé :

*Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste, responsable d'infections respiratoires aiguës graves chez les patients sous ventilation mécanique (PAVM) dont le pronostic reste défavorable. Le système de sécrétion de type 3 (SST3) de *P. aeruginosa* est un facteur de virulence majeur dont la présence est associée à un pronostic défavorable chez les patients atteints d'une PAVM. Outre son rôle dans la translocation d'exotoxines cytotoxiques, le SST3 est reconnu NLRC4, un récepteur intracellulaire de l'immunité innée. La reconnaissance par NLRC4 va conduire à l'activation de la caspase-1, entraînant d'une part la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'autre part la mort de la cellule infectée. Cet ensemble est appelé NLRC4-inflammasome. Dans cette étude, nous avons évalué l'implication du NLRC4-inflammasome dans un modèle murin de pneumonie aiguë à *P. aeruginosa* en comparant des souris Wild-type (*Wt*) et *Nlrc4*<sup>-/-</sup> de même fond génétique. Nous montrons que l'activation du NLRC4-inflammasome par le SST3 est délétère indépendamment de la présence des exotoxines. Tout d'abord, l'activation de NLRC4 augmente la lésion pulmonaire induite par la réponse inflammatoire de l'hôte. De plus, l'activation du NLRC4-inflammasome entraîne la répression de la voie Th17 impliquée dans l'expression de peptides antimicrobiens dans les voies aériennes. Par conséquent l'activation de NLRC4 entraîne une diminution de la clairance bactérienne et contribue à augmenter la mortalité induite au cours de l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. Dans un second temps, nous avons évalué l'intérêt de traitements inhibiteurs du NLRC4-inflammasome dans un modèle murin de pneumonie aiguë à *P. aeruginosa*. Enfin nous avons évalué l'intérêt de biomarqueurs de la réponse de l'hôte pour poser l'indication de thérapeutiques adjuvantes spécifiques inhibant le SST3 de *P. aeruginosa*.

