



Inserm

La science pour la santé —
From science to health



Journée G2i - SPILF

Effets des immunosuppresseurs de transplantation solide sur l'immunité épithéliale dans les infections respiratoires aiguës à *P.aeruginosa*

Kevin SERMET

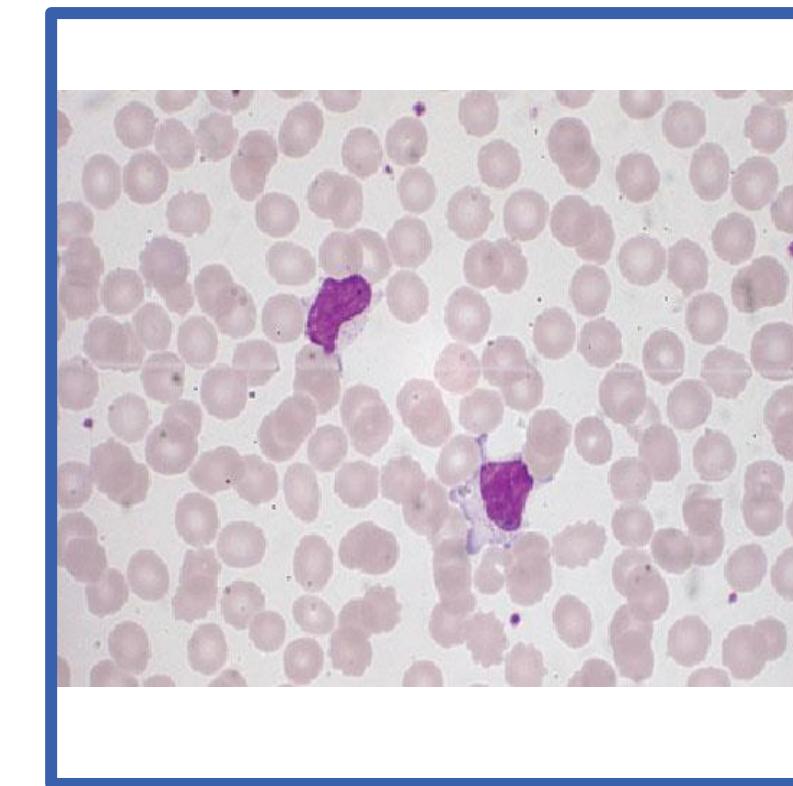
13/01/2023

Projet de recherche translationnelle

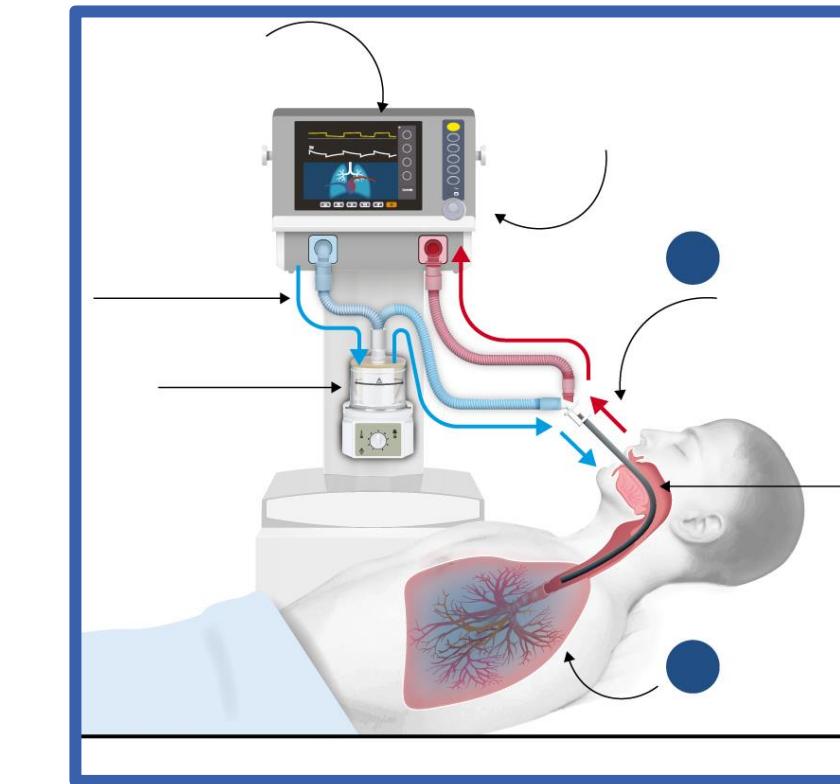
Appareil respiratoire : 2^e site en fréquence des patients transplantés d'organe solide (TOS)¹



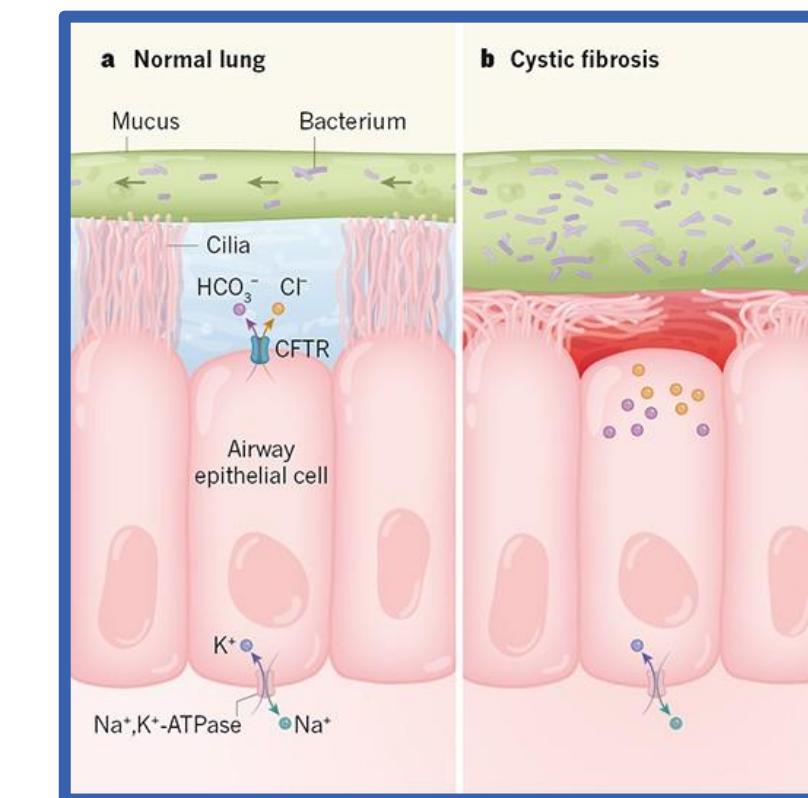
P.aeruginosa : Top 5 des pneumonies du TOS¹, mortalité 30-35%²



Neutropénie



Rupture de barrière

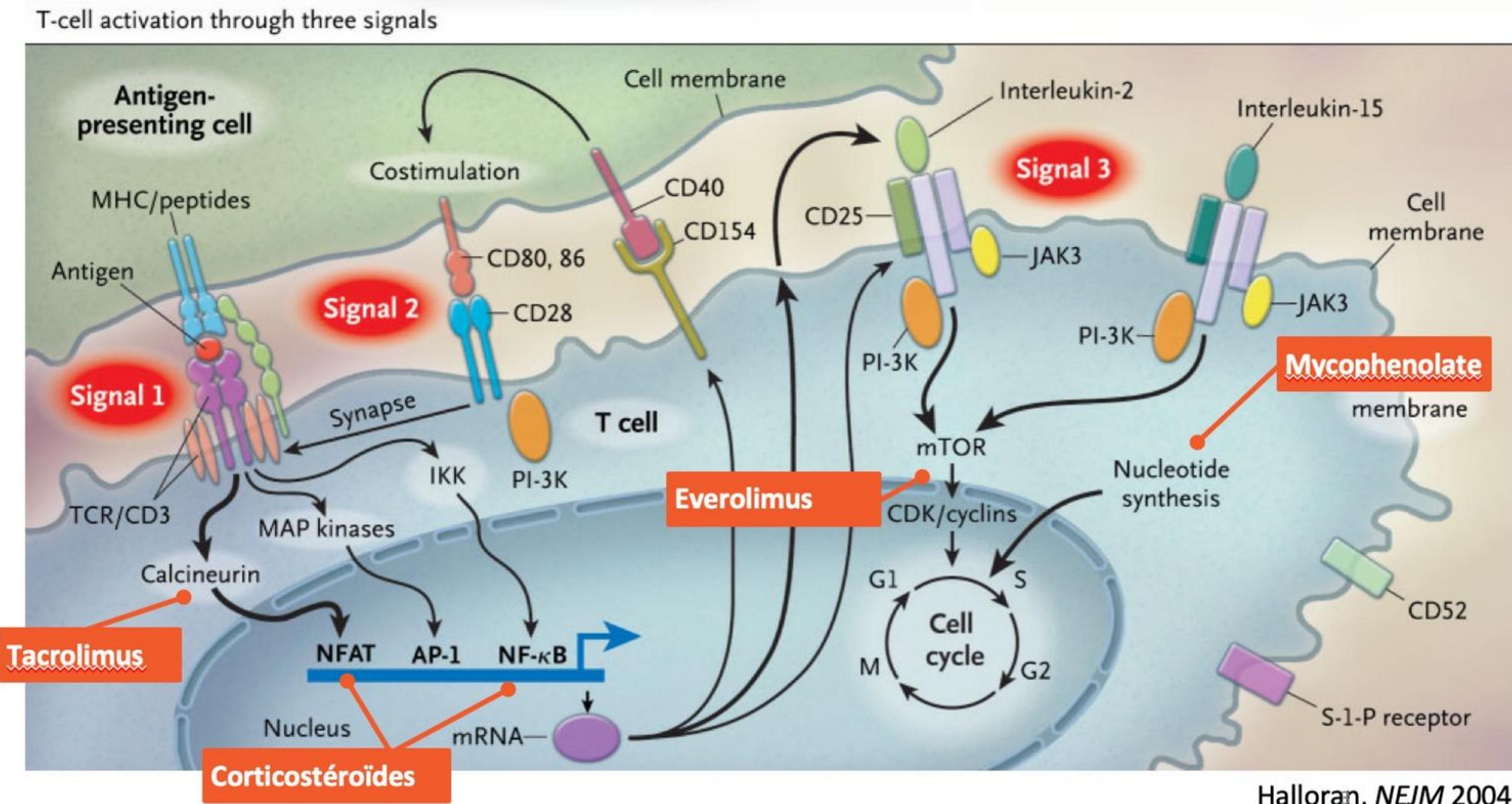


Altération mucociliaire

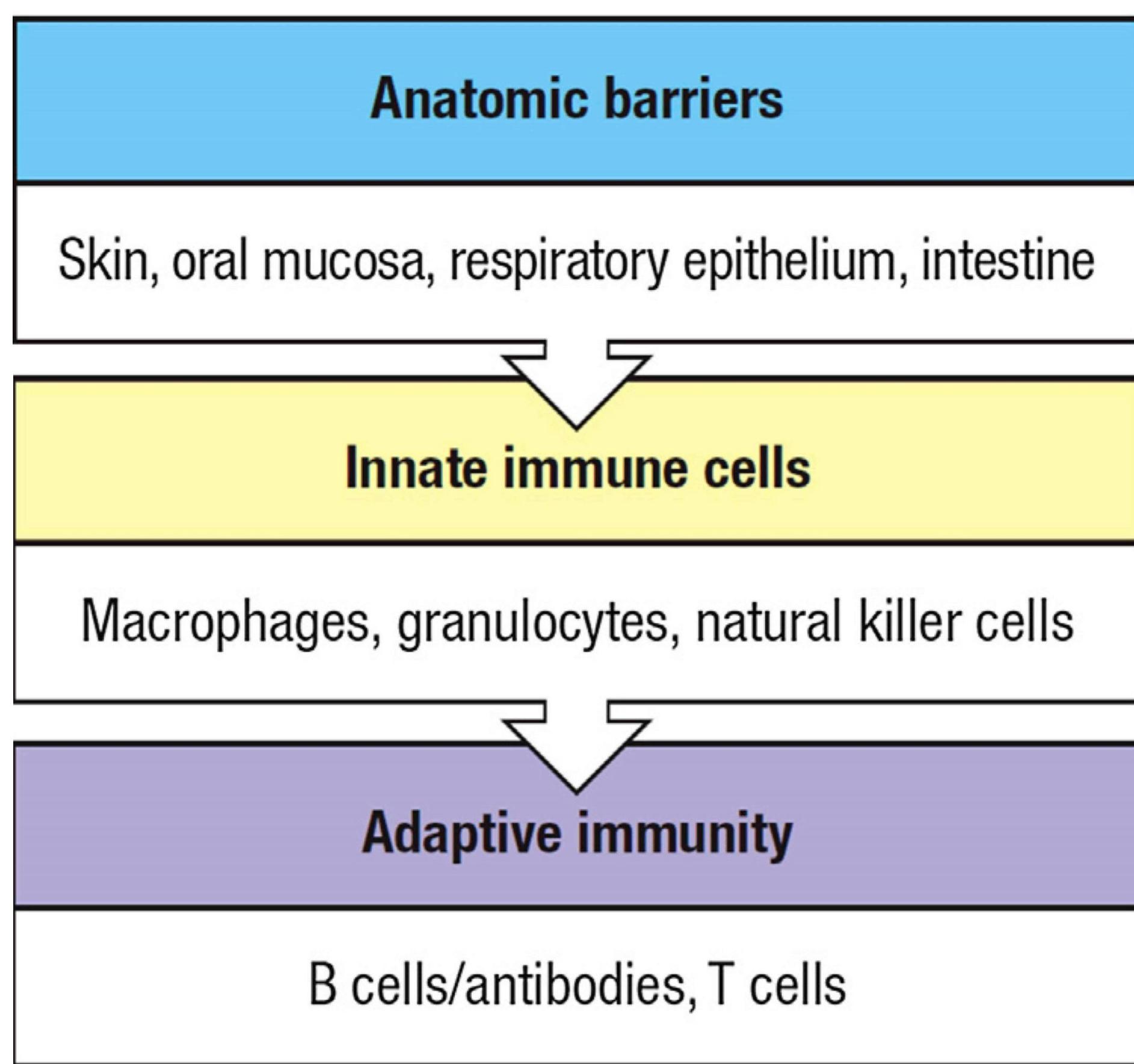
¹ Van Delden CID 2020

² Su Ann Transpl 2016

Les mécanismes d'action connus des immunosuppresseurs relèvent de l'immunité adaptative

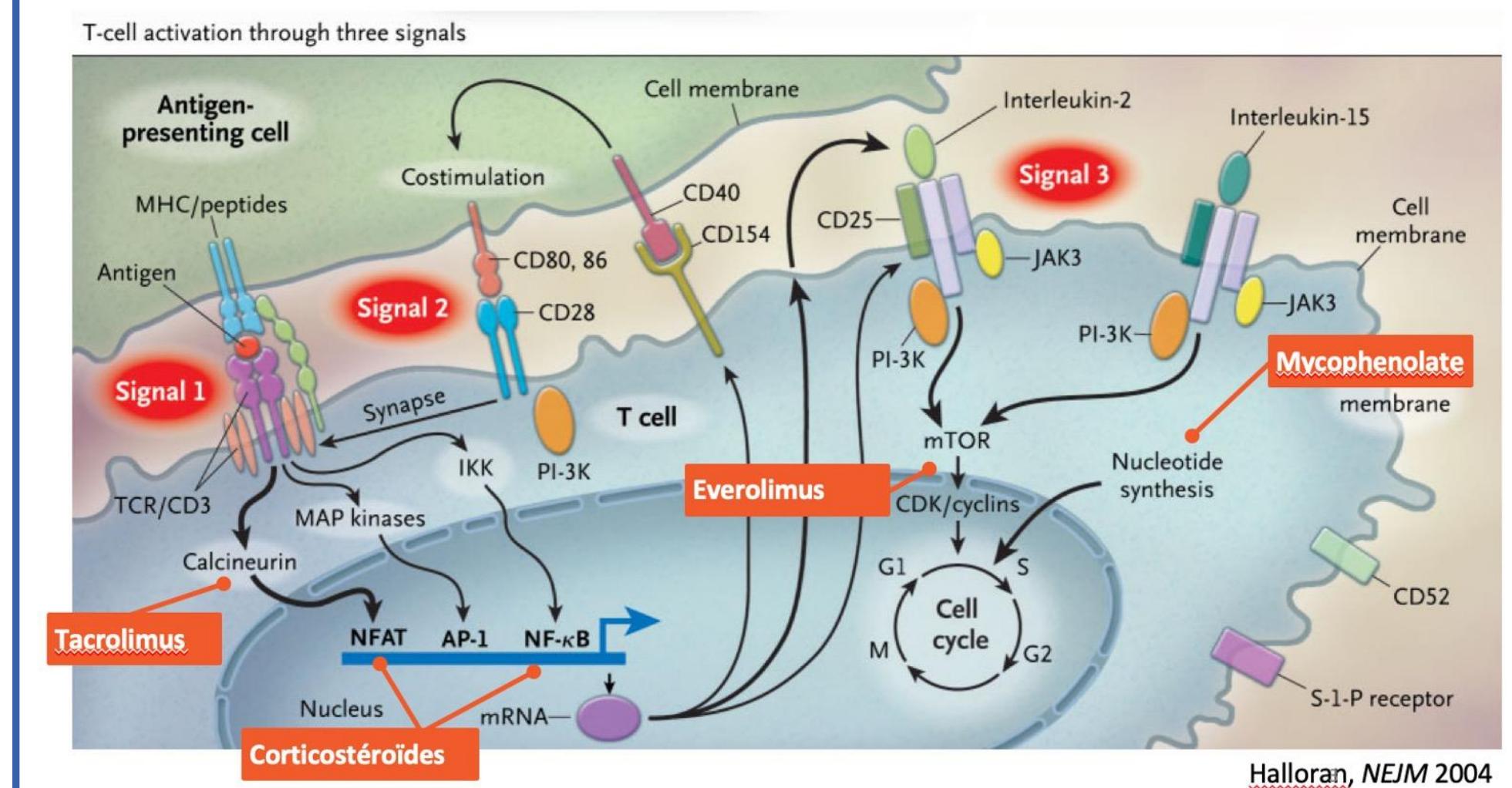


Question de Recherche

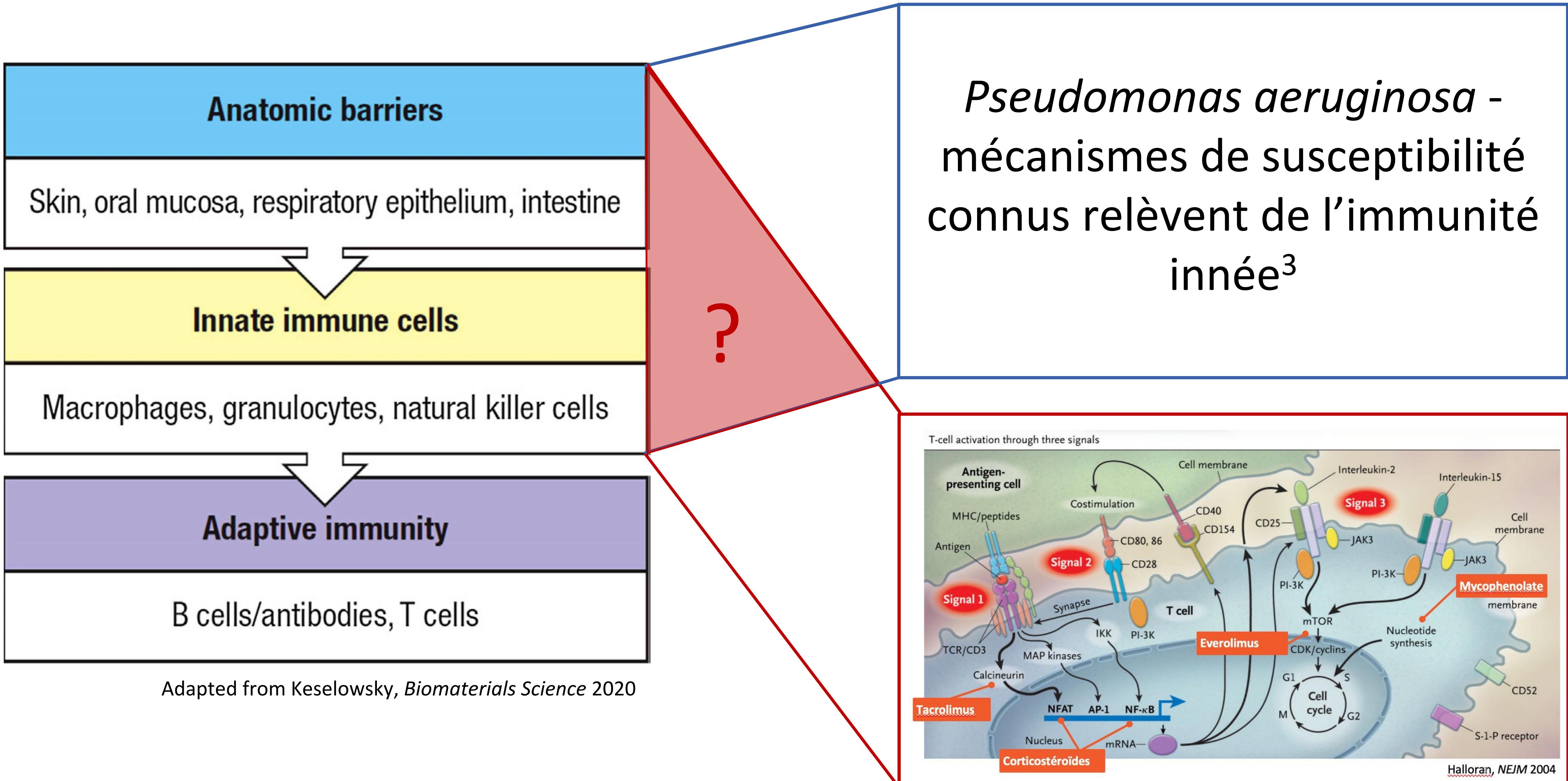


Adapted from Keselowsky, *Biomaterials Science* 2020

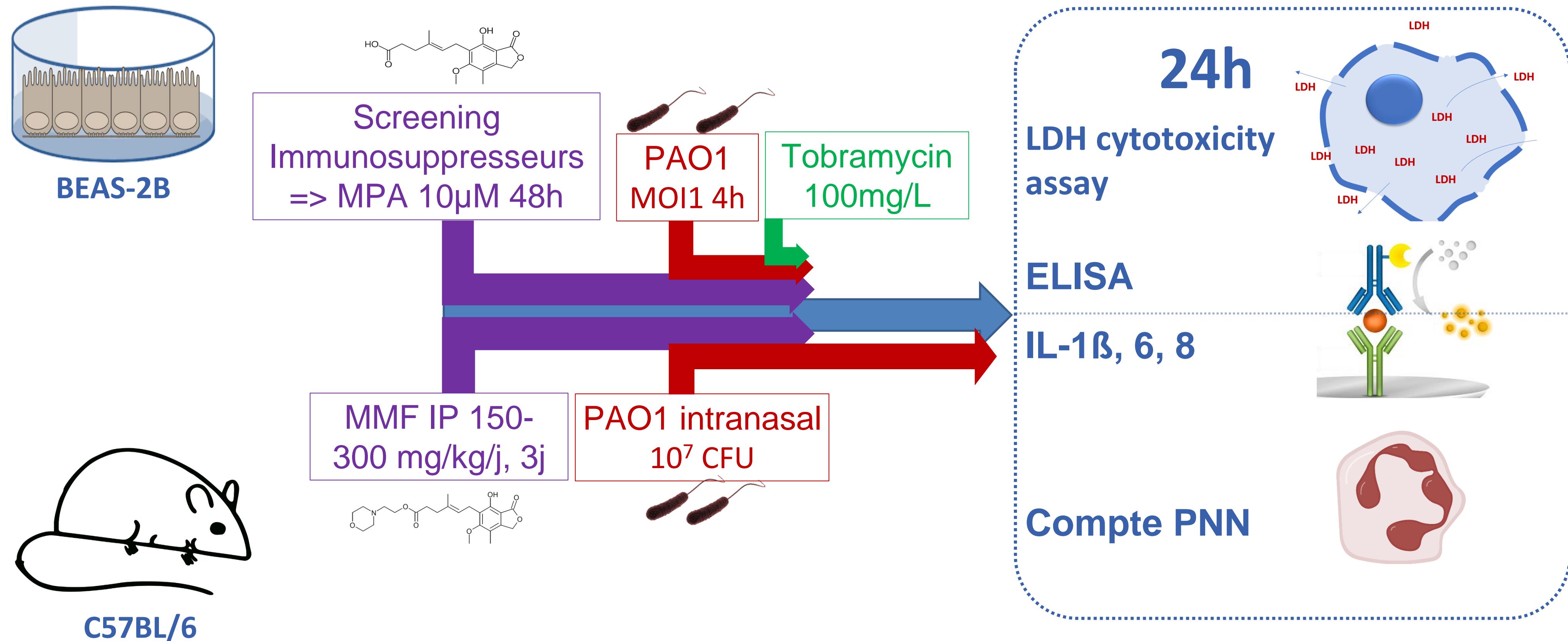
Pseudomonas aeruginosa -
mécanismes de susceptibilité
connus relèvent de l'immunité
innée³



Question de Recherche



Modèles



RESULTATS

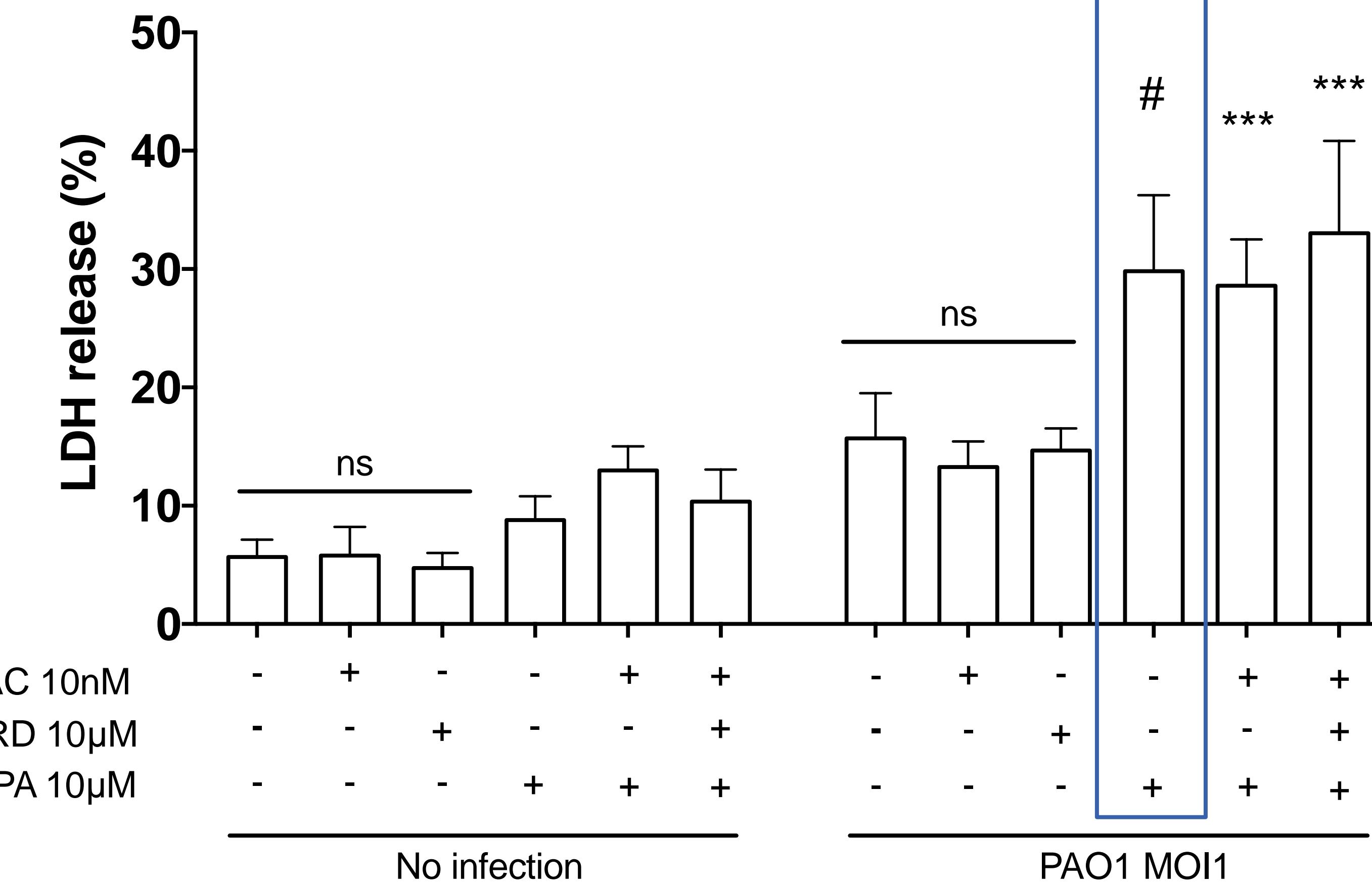
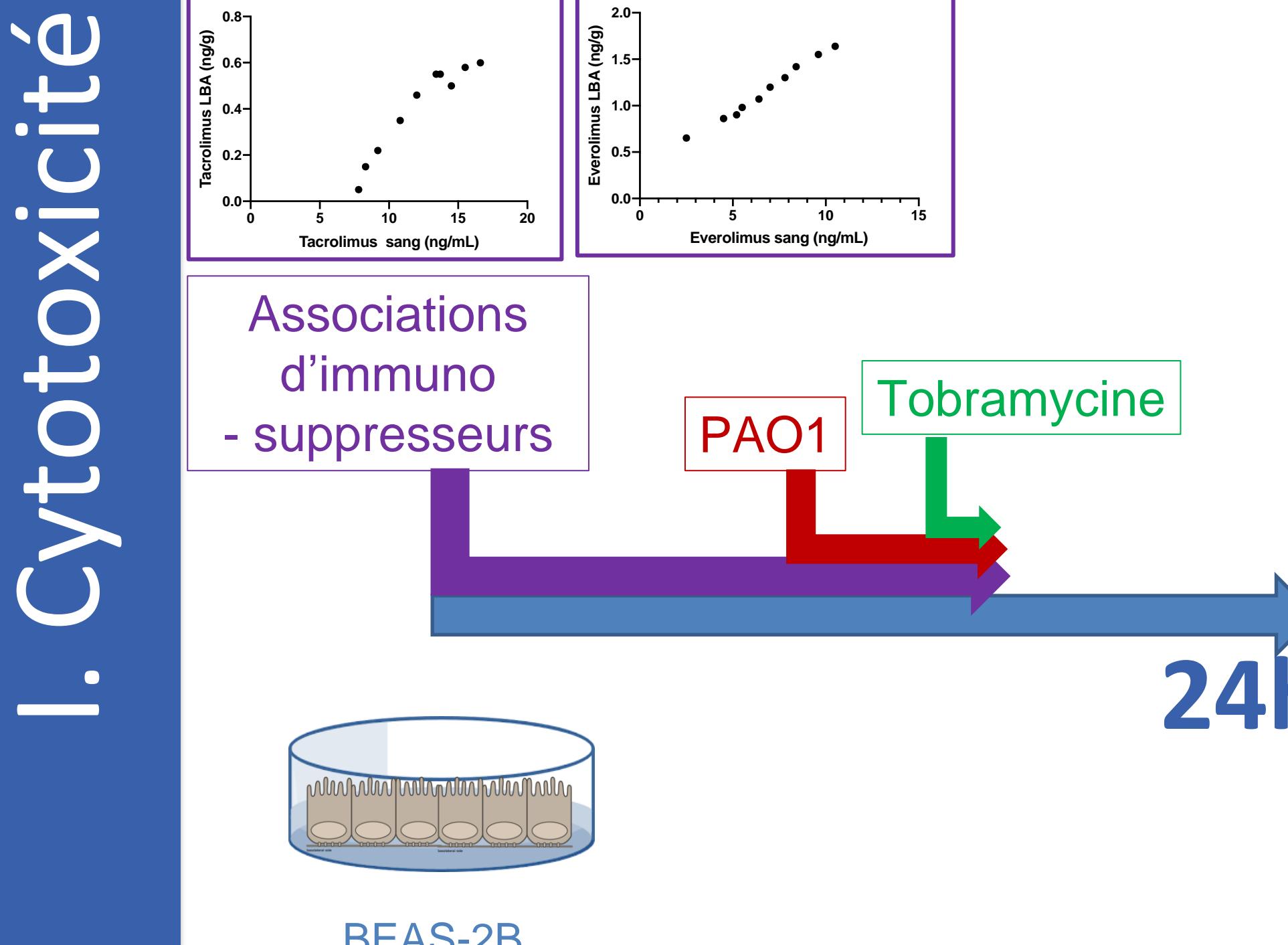
- I. Cytotoxicité épithéliale
- II. Perte de réponse inflammatoire épithéliale

RESULTATS

I. Cytotoxicité épithéliale

II. Perte de réponse inflammatoire épithéliale

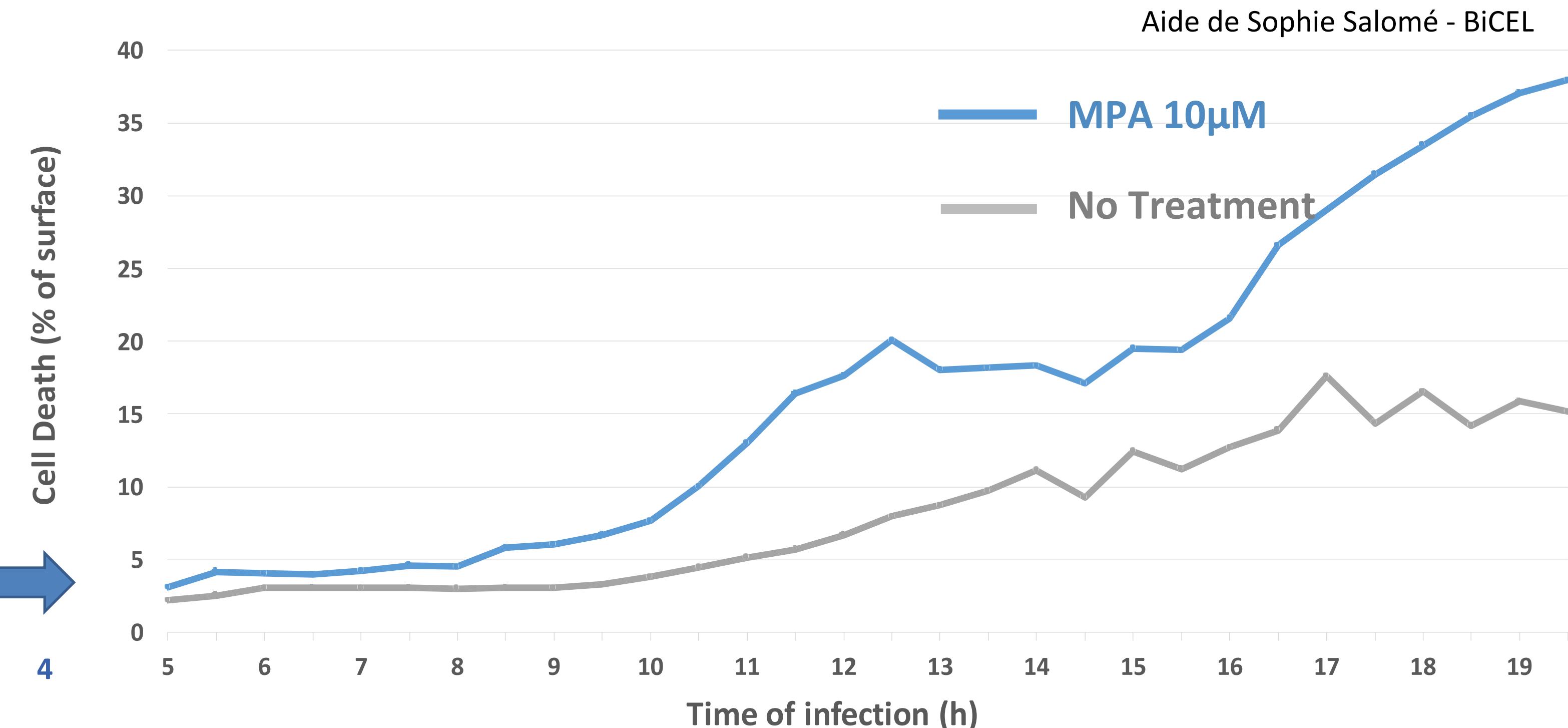
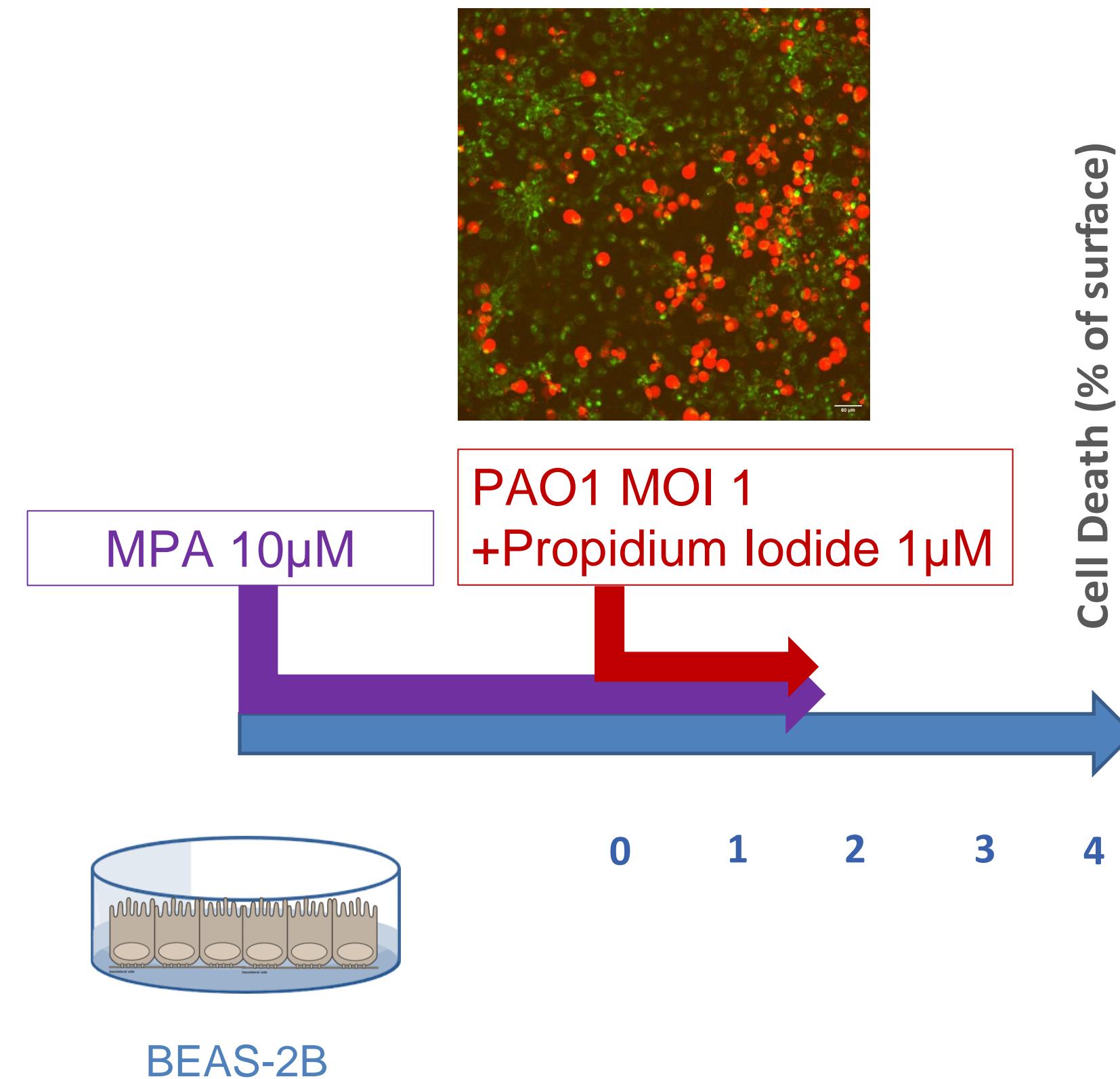
Le MPA seul ou en association augmente la cytotoxicité épithéliale induite par l'infection à PAO1



n = 14-15 ; 5 independent experiments

Le MPA augmente la mort cellulaire épithéliale induite par l'infection à PAO1

I. Cytotoxicité

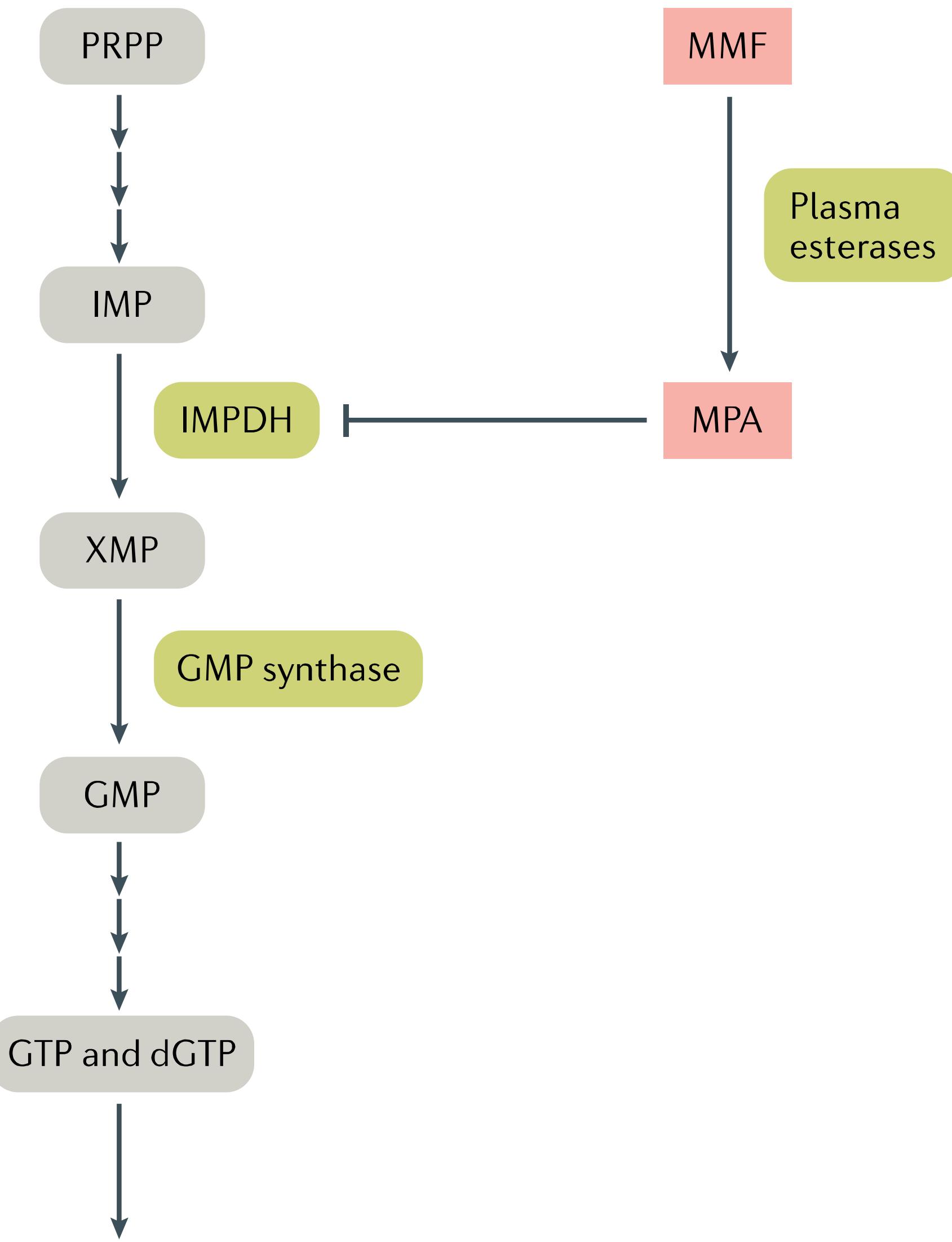


Aide de Sophie Salomé - BiCEL

n = 3 fields ; 1 experiment

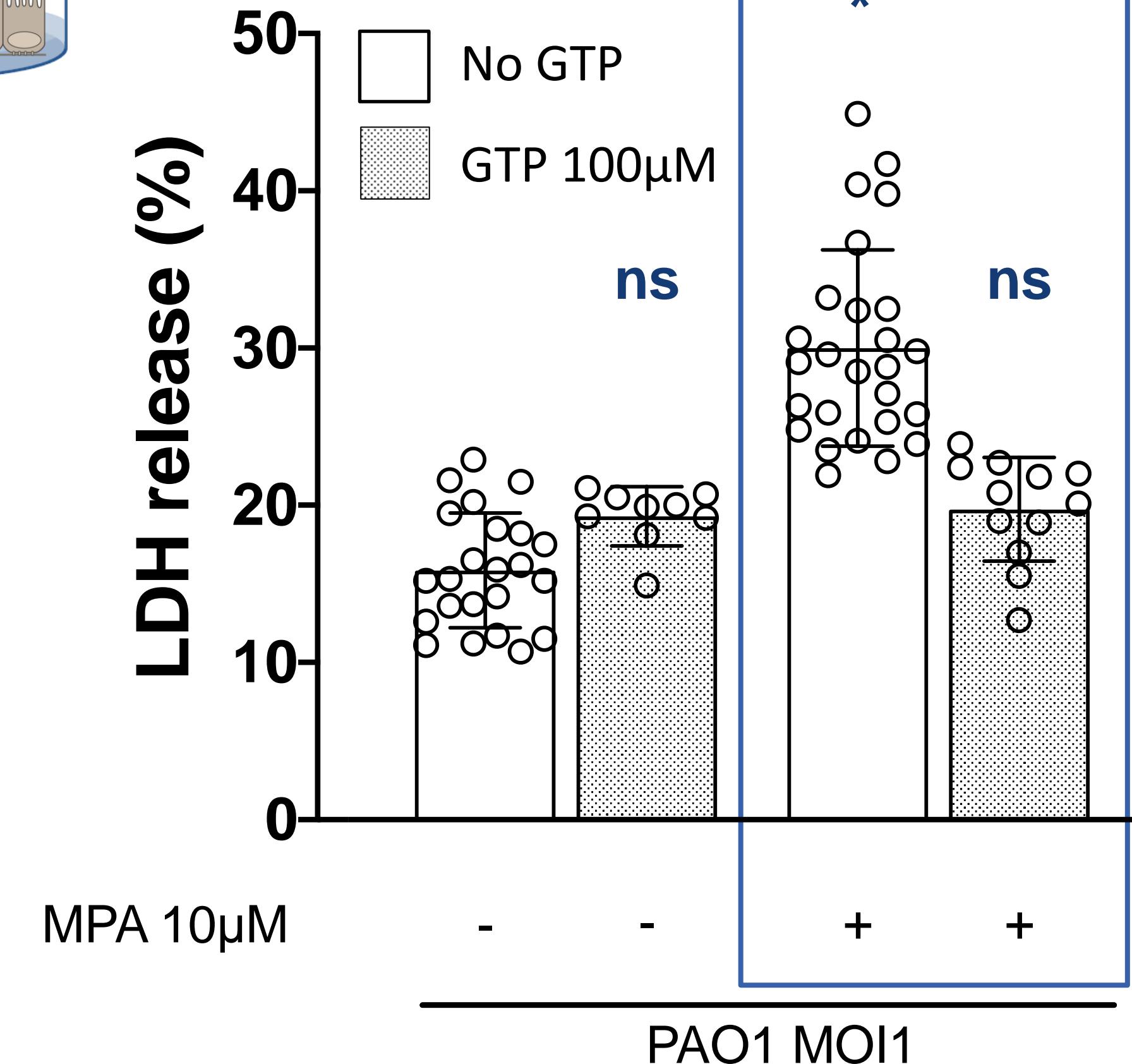
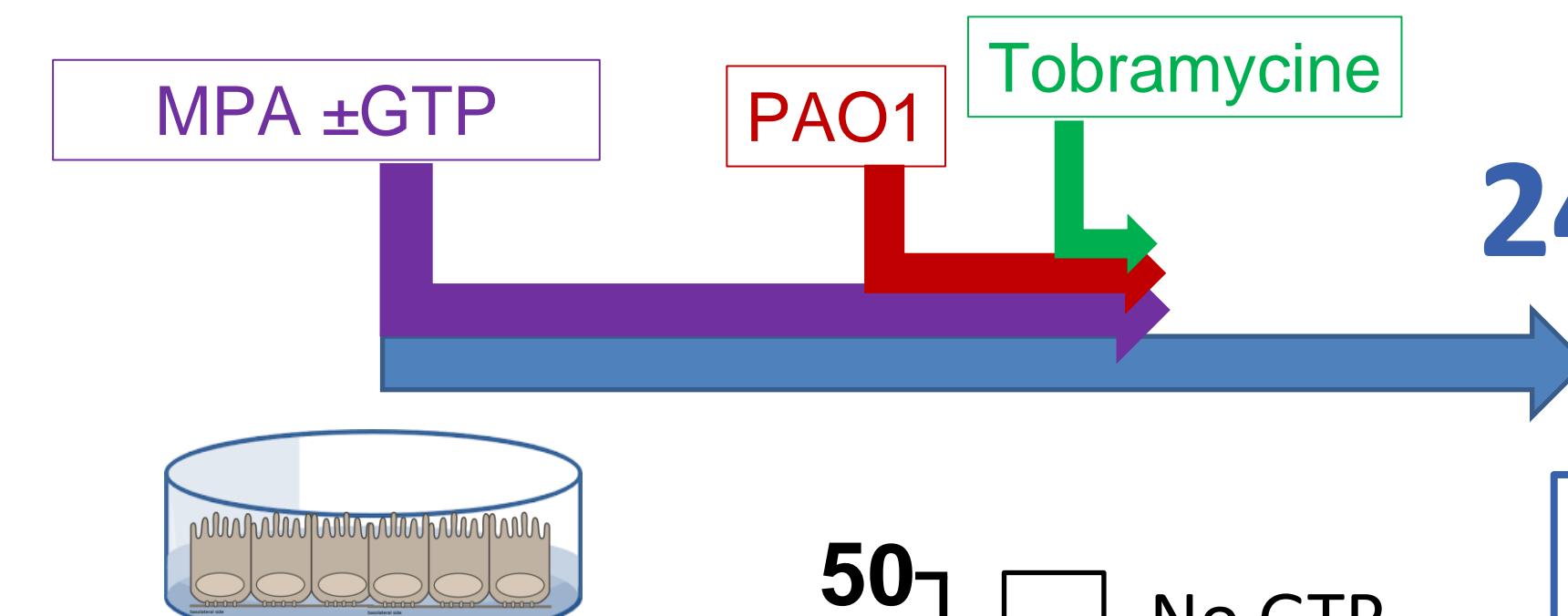
Le GTP corrige l'augmentation de la cytotoxicité induite par le MPA lors de l'infection à PAO1

I. Cytotoxicité



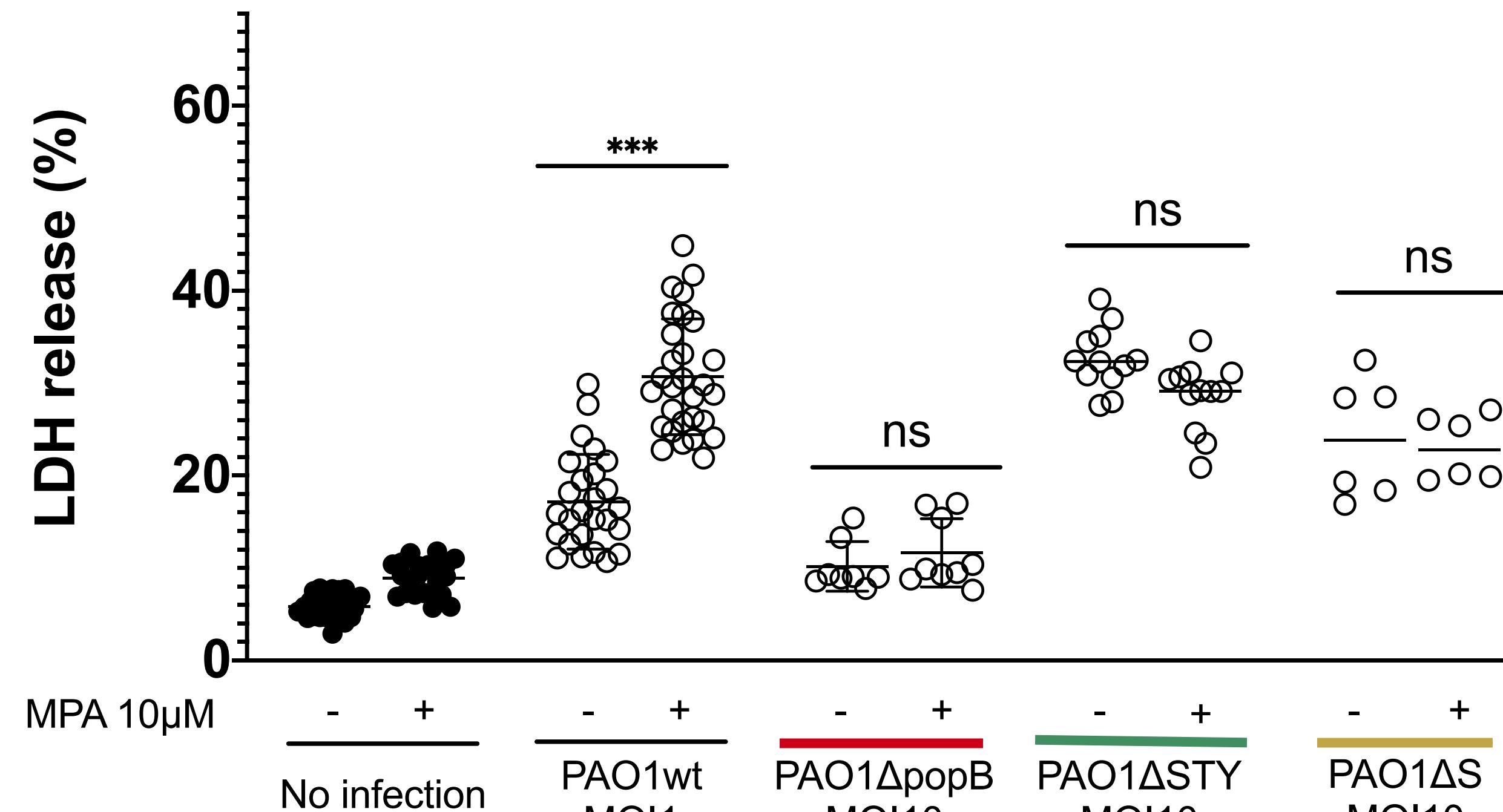
DNA synthesis and cell proliferation

Broen Nat Rev Rheumatol 2020

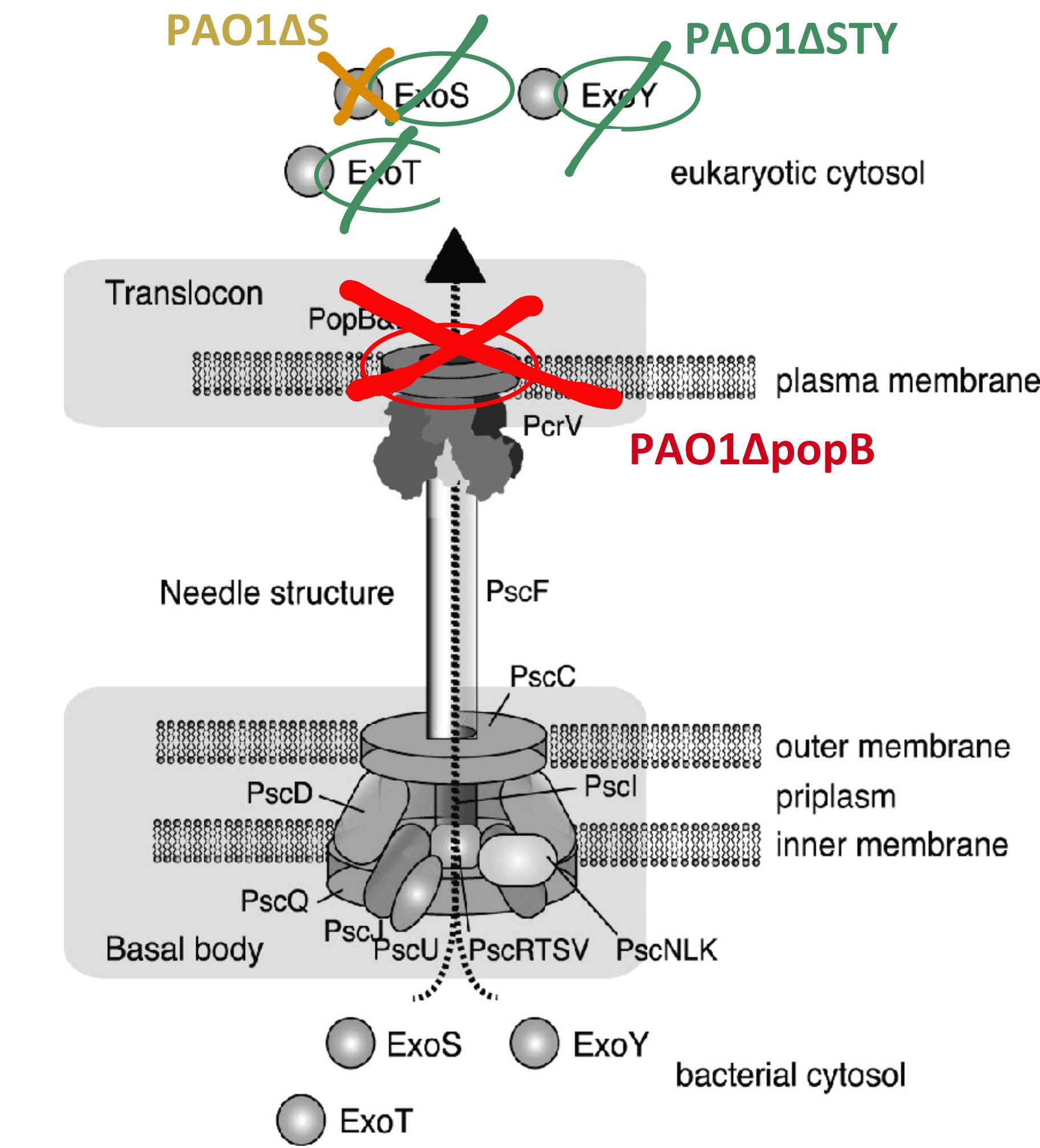


L'augmentation de cytotoxicité liée au MPA est ExoS-dépendante

I. Cytotoxicité

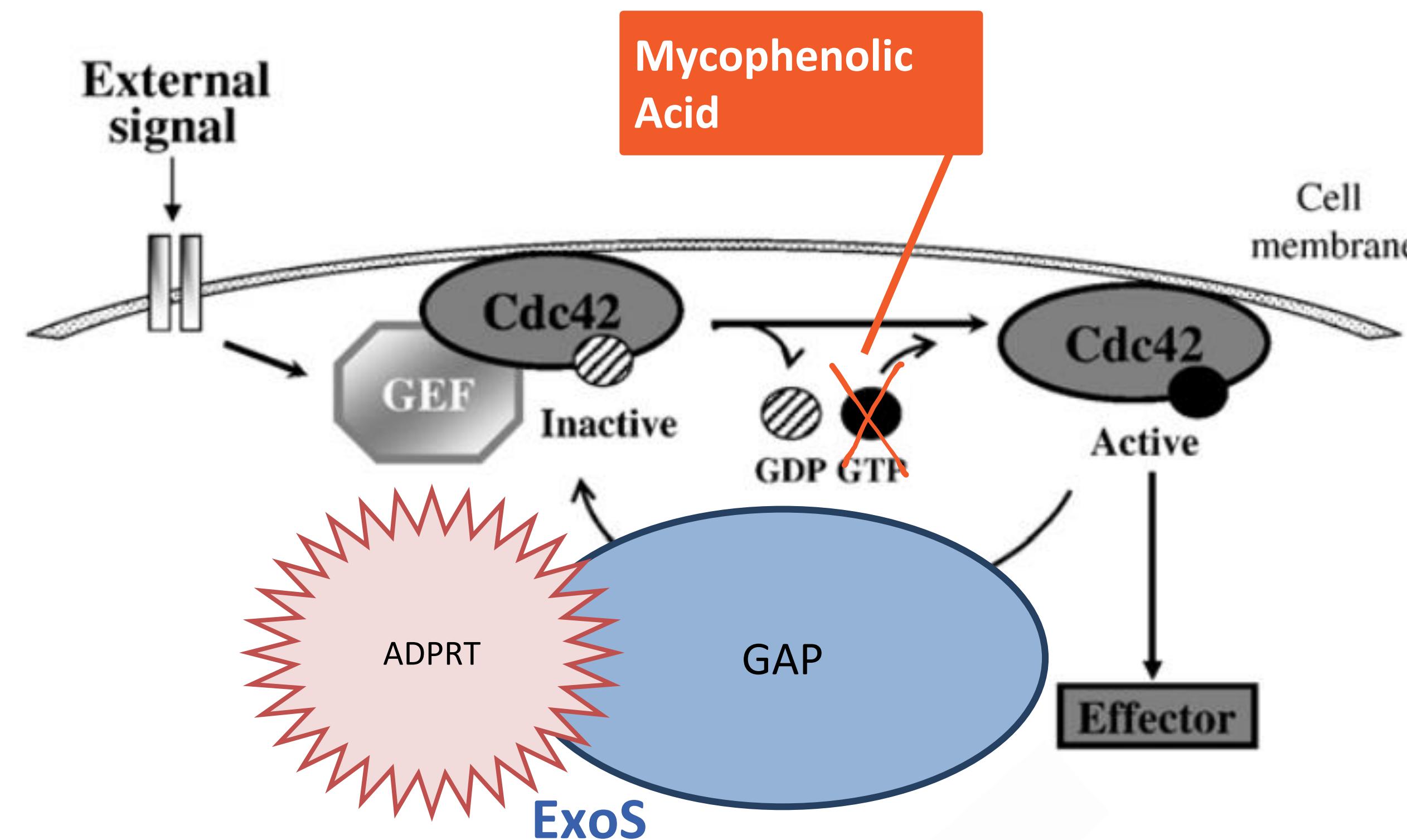


Souches Dr V.Deruelle – Pasteur Paris
& Dr I.Attrée – PBRC Grenoble



I. Cytotoxicité

Effet cumulatif possible entre le MPA et ExoS via son domaine GAP ?



Conclusion Axe I

I. Cytotoxicité

Le MPA majore la cytotoxicité épithéliale respiratoire PAO1-induite

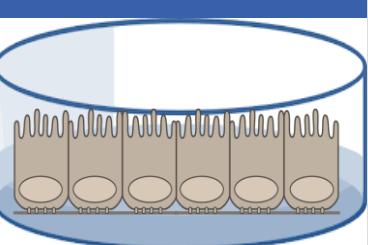
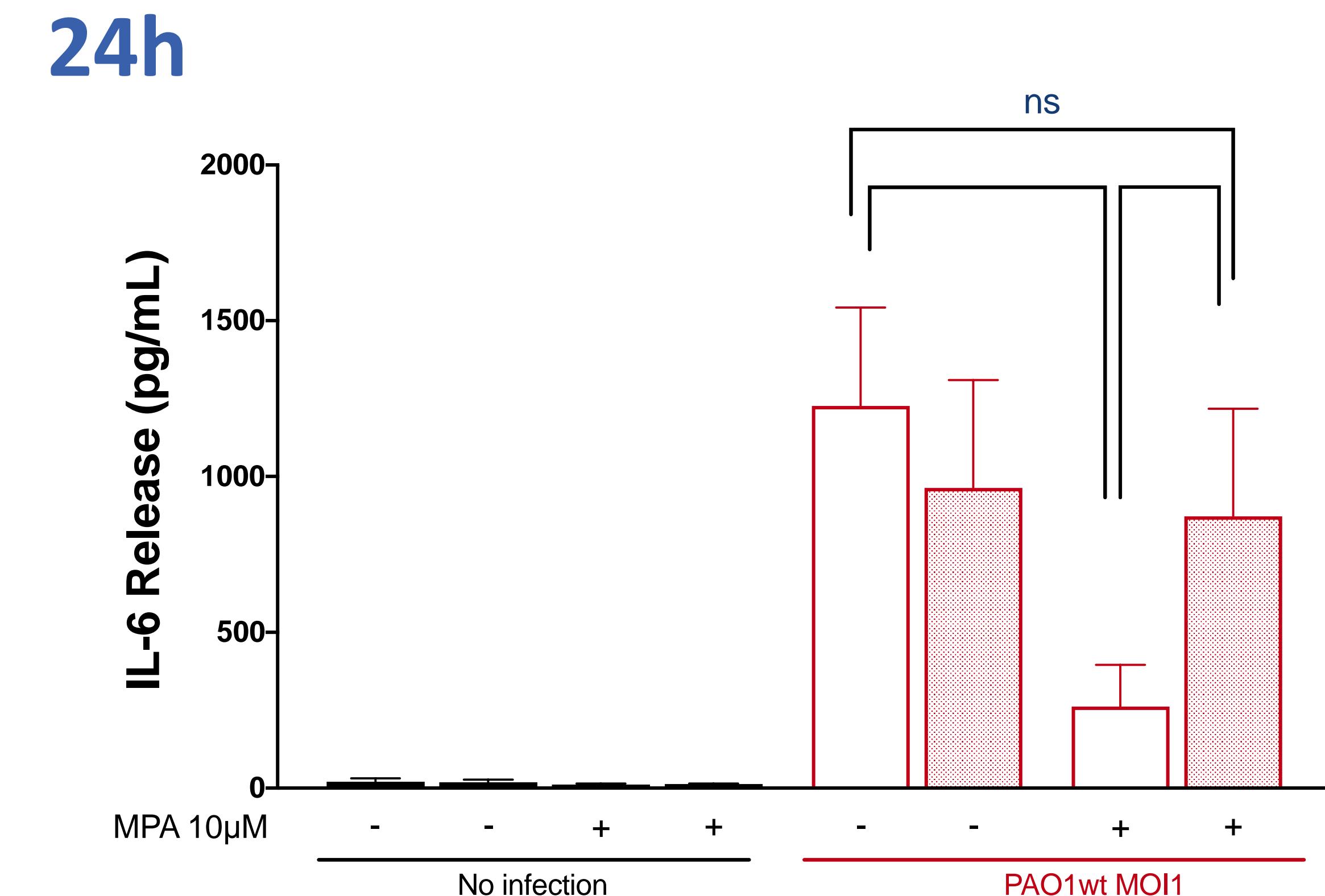
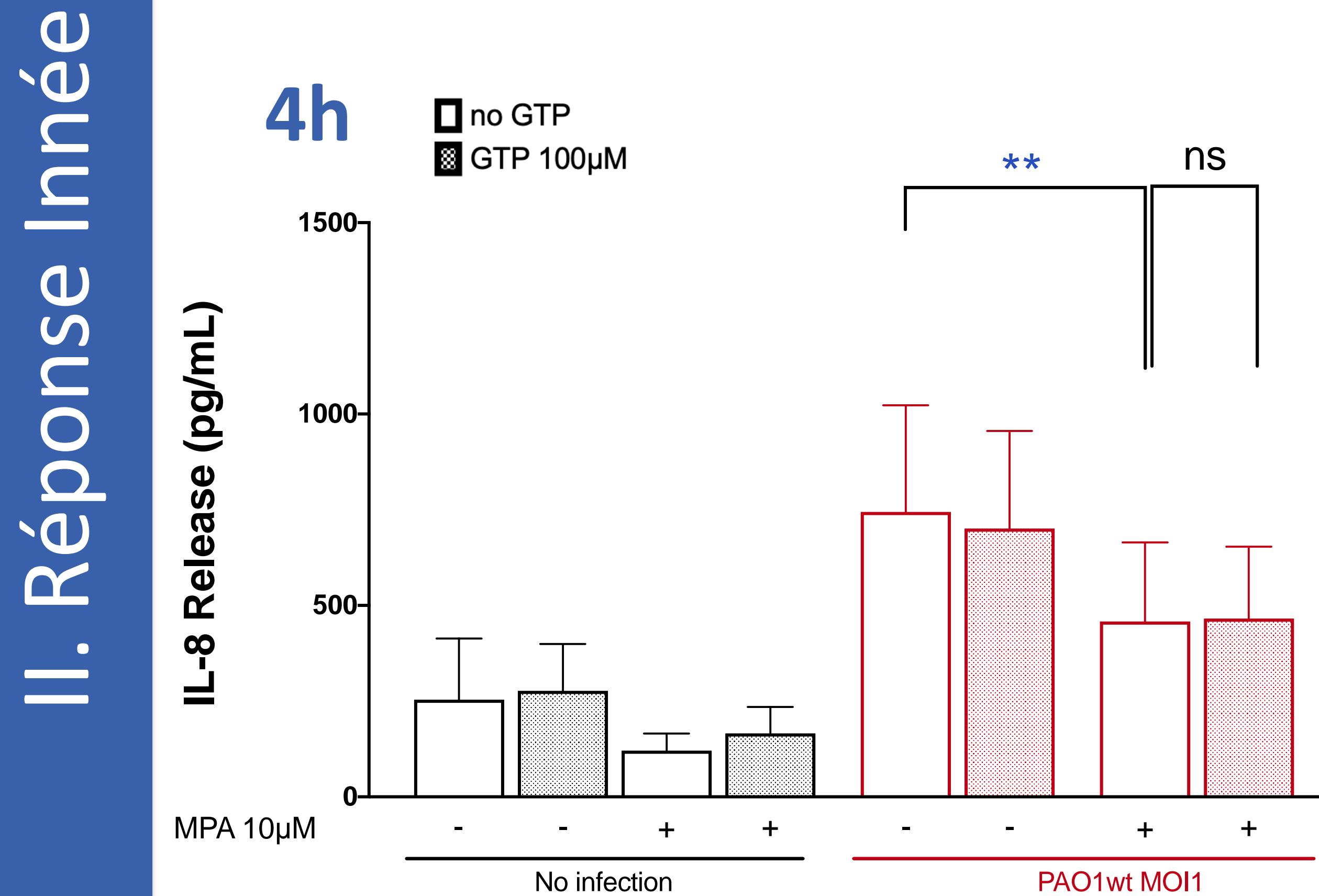
- de façon GTP-dépendante
- de façon Exo-S dépendante

RESULTATS

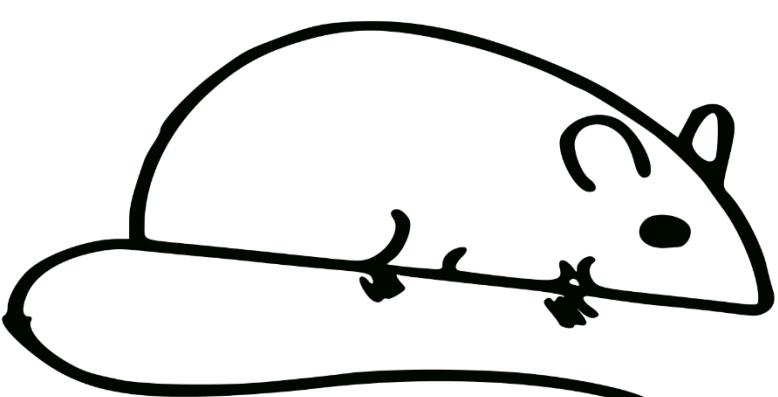
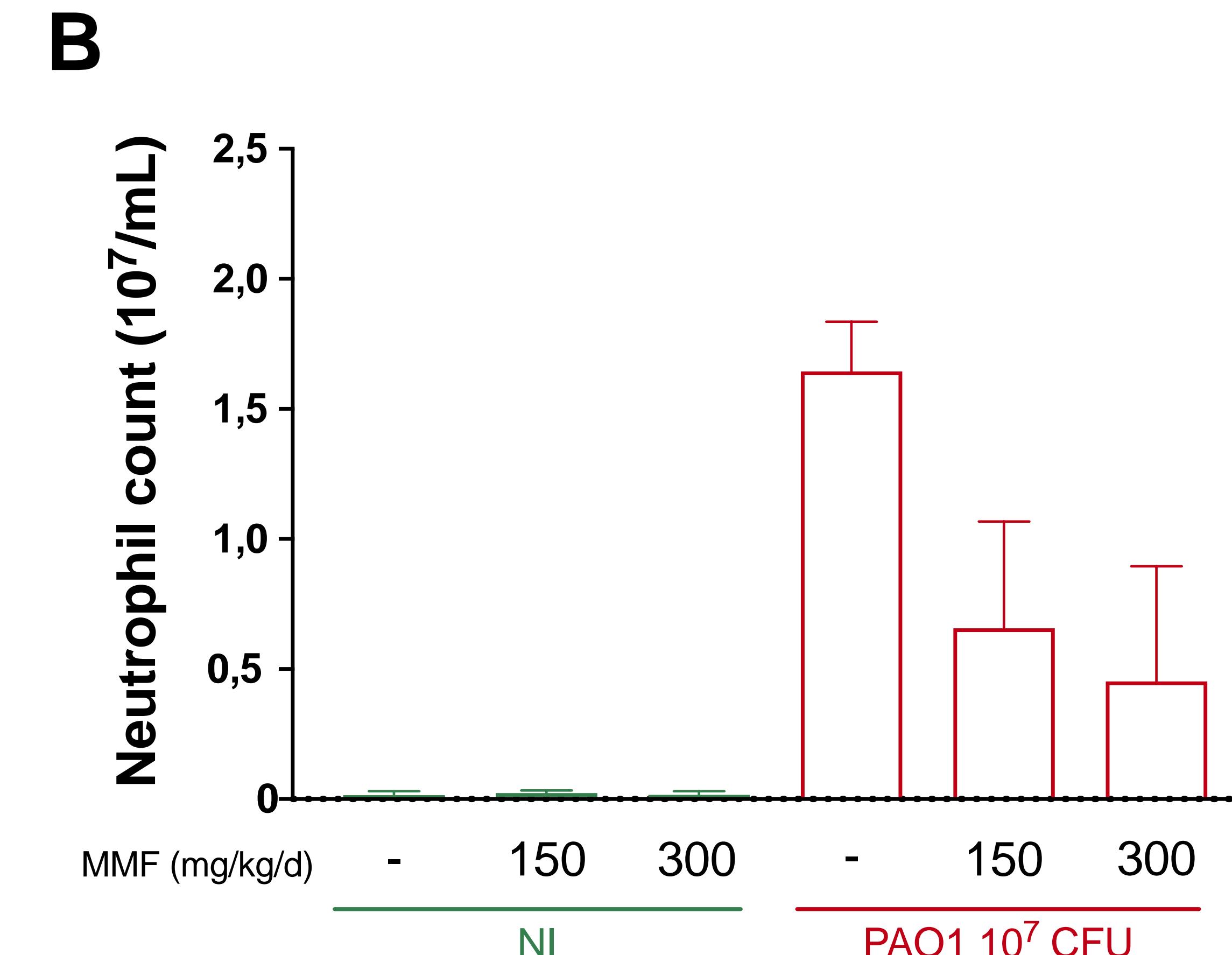
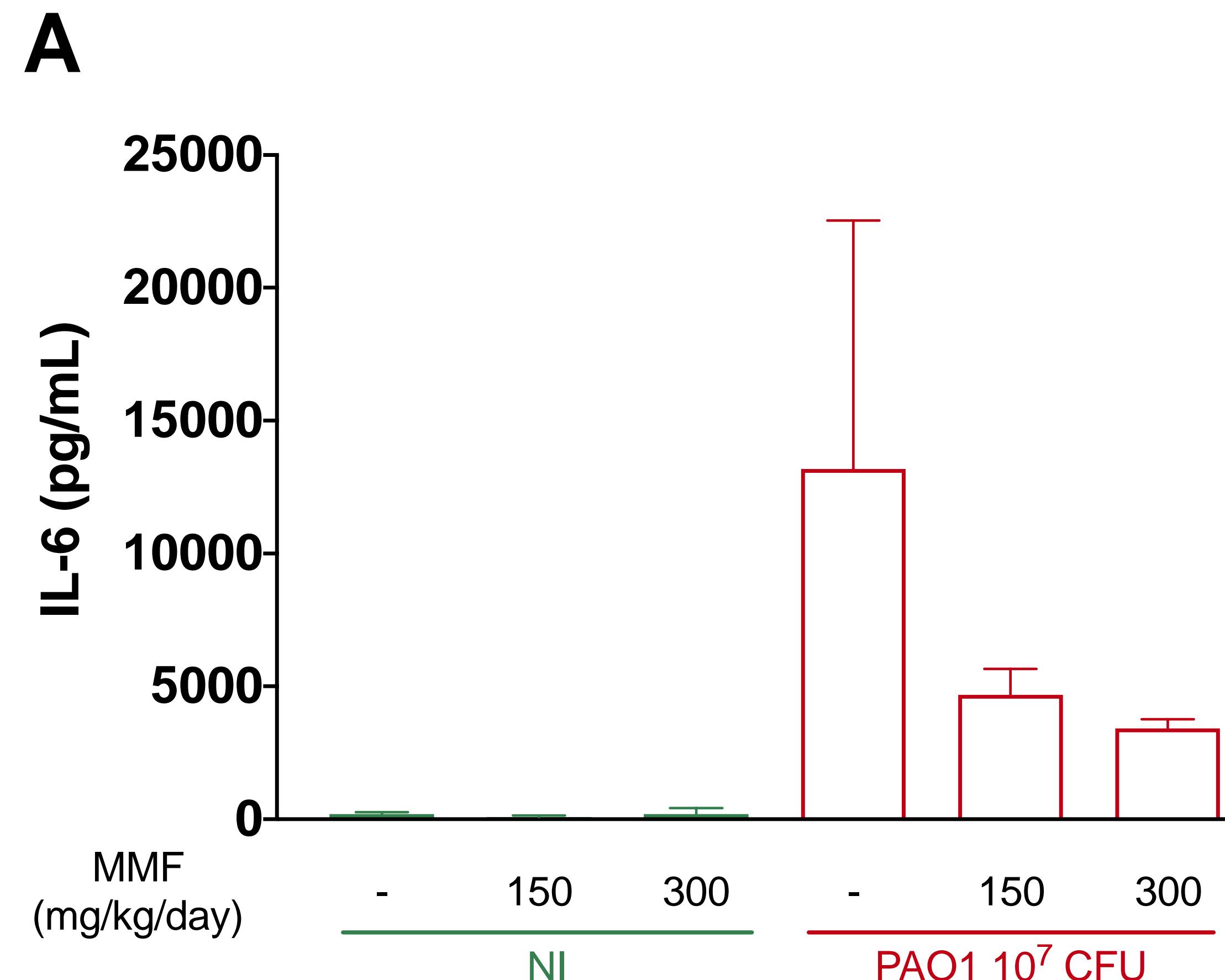
I. Cytotoxicité épithéliale

II. Perte de réponse inflammatoire épithéliale

Le MPA diminue les productions épithéliales d'IL-6 et 8 en réponse à PAO1

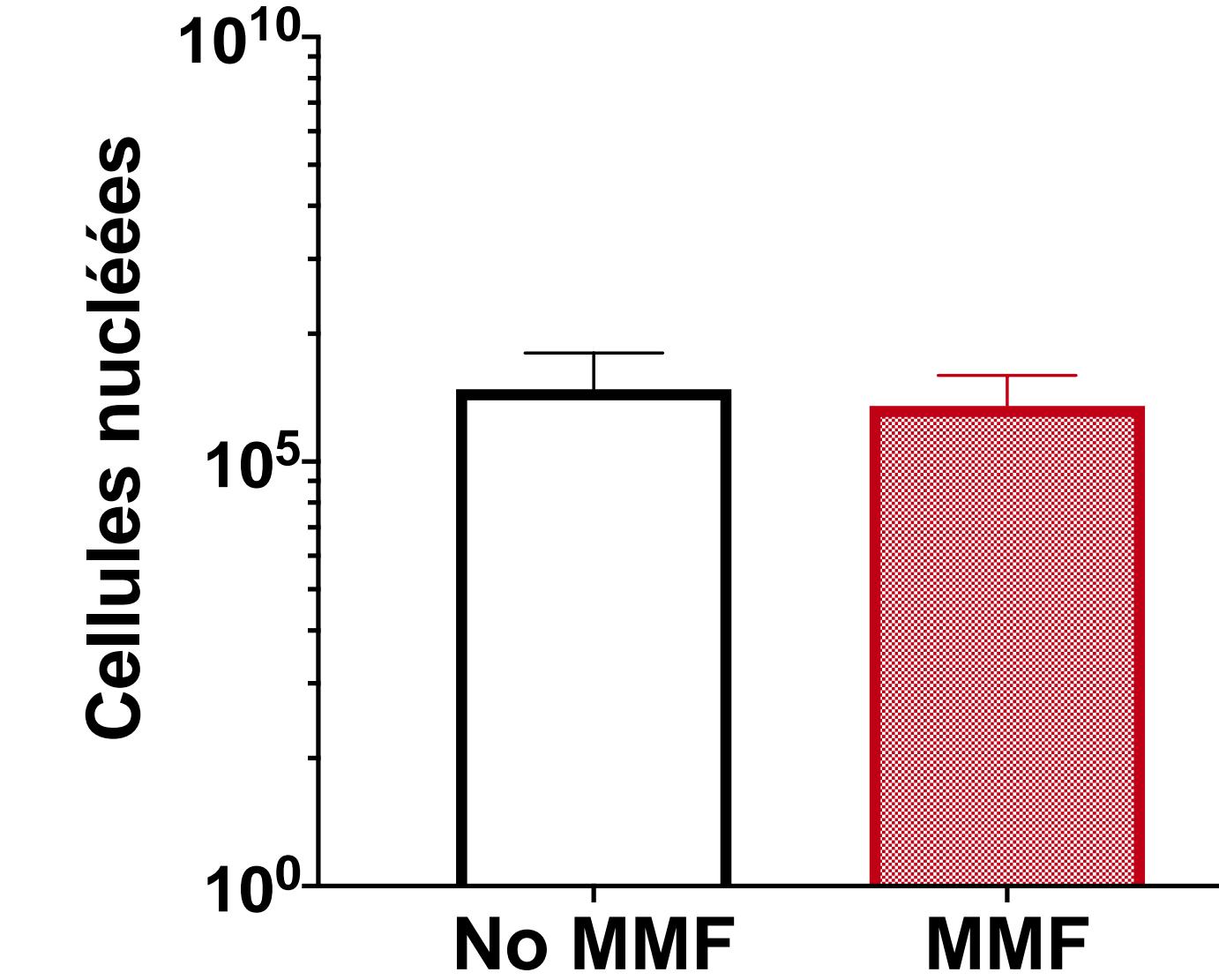
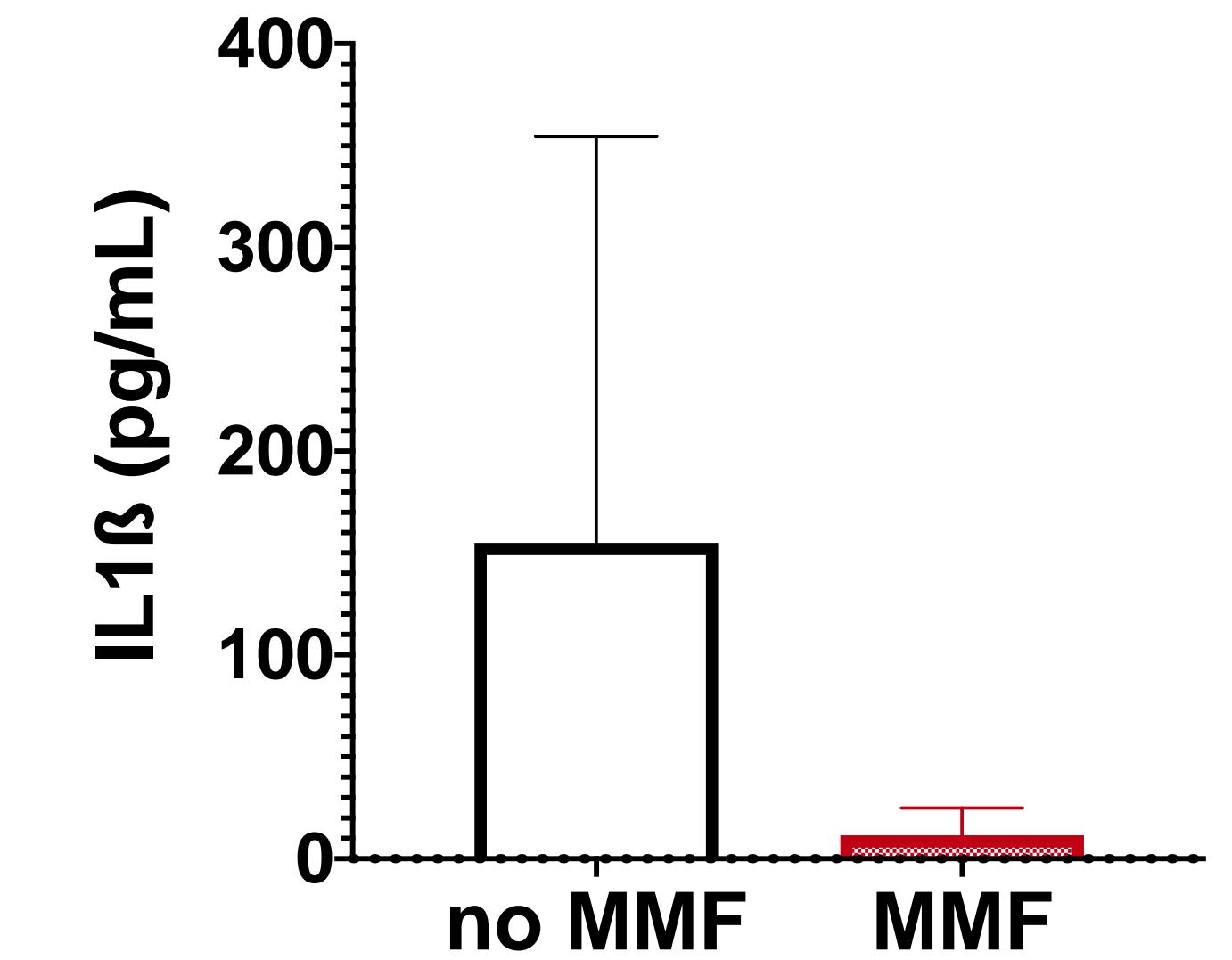
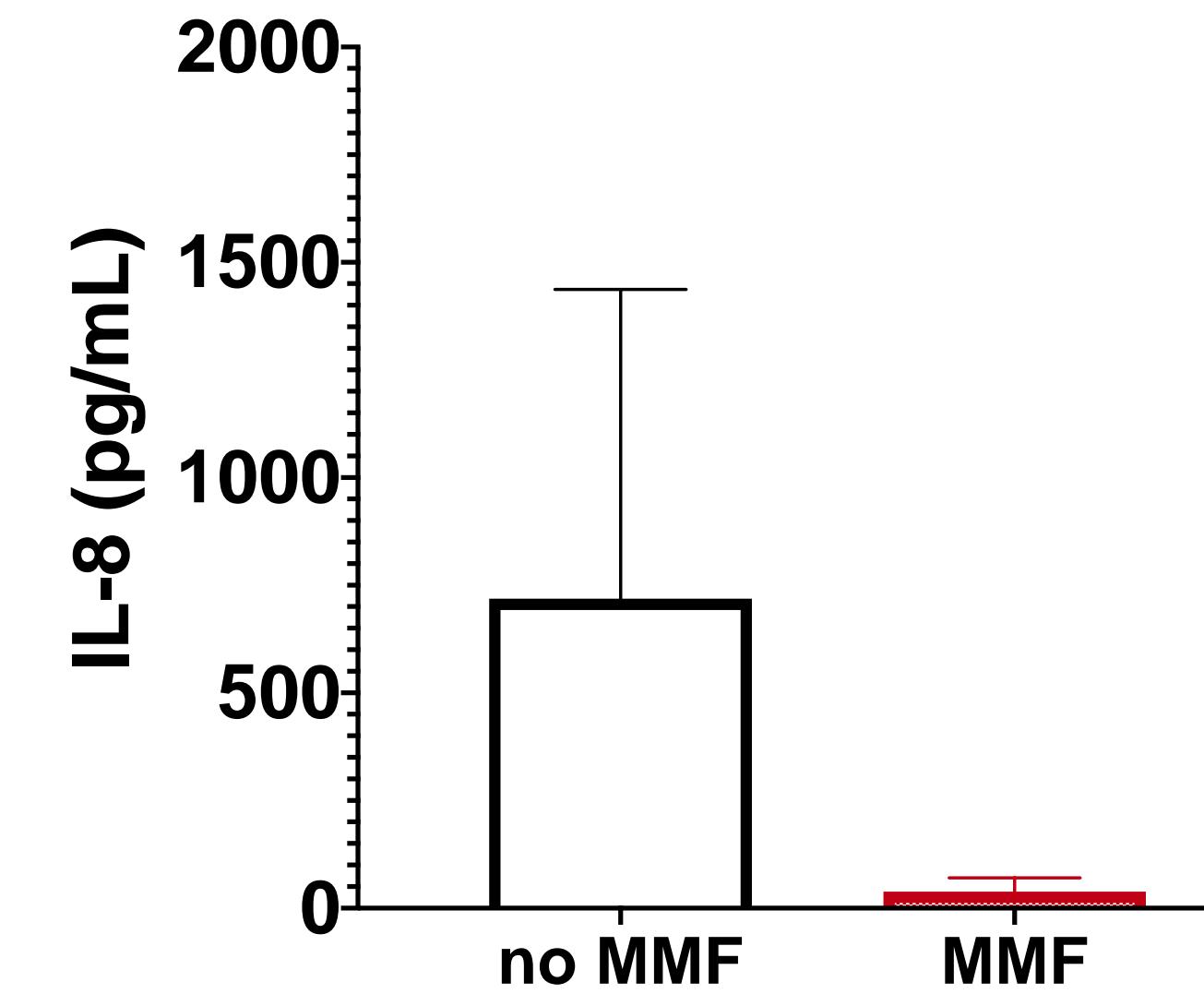
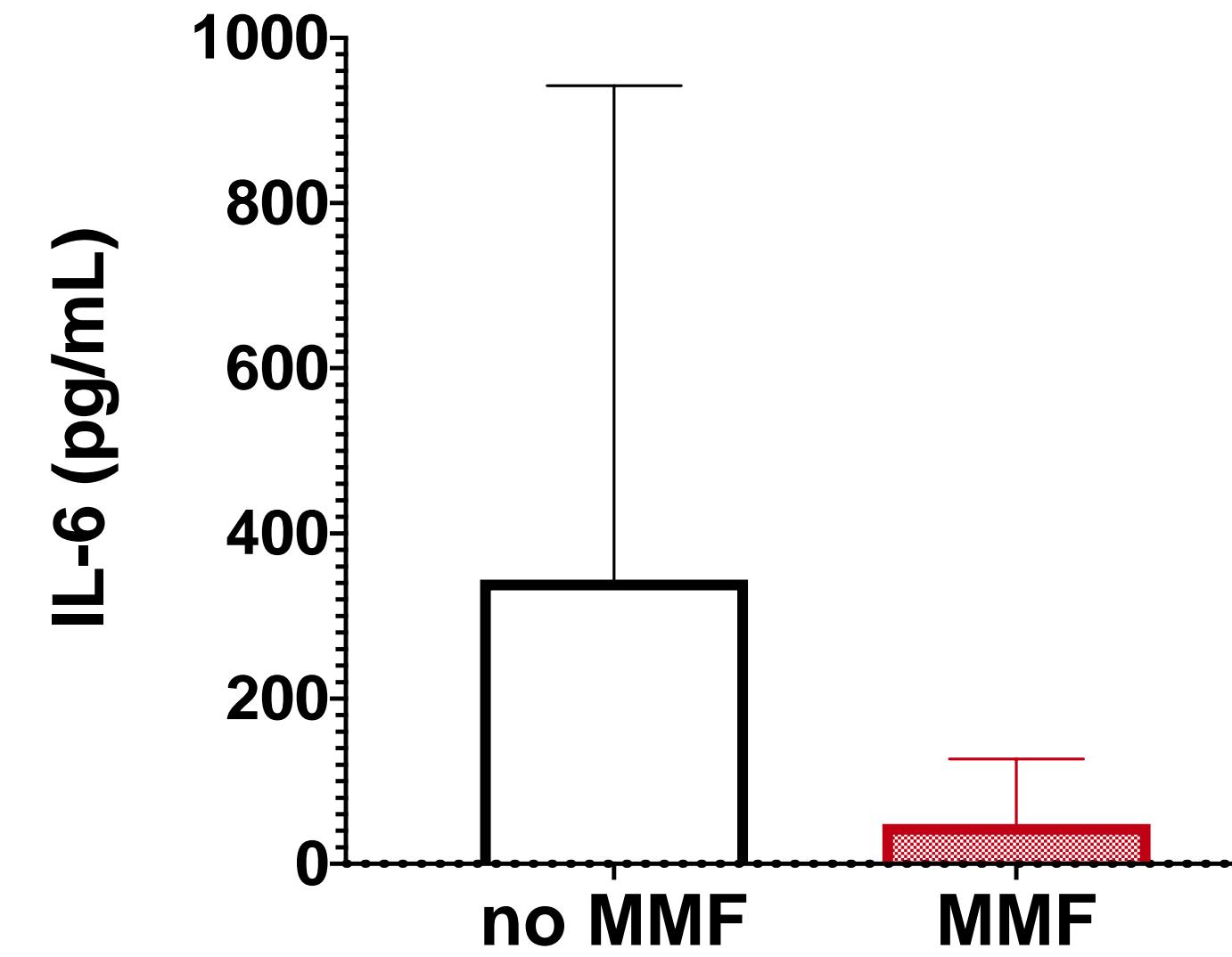


Il existe peut-être une diminution de la réponse innée chez les souris traitées par MMF



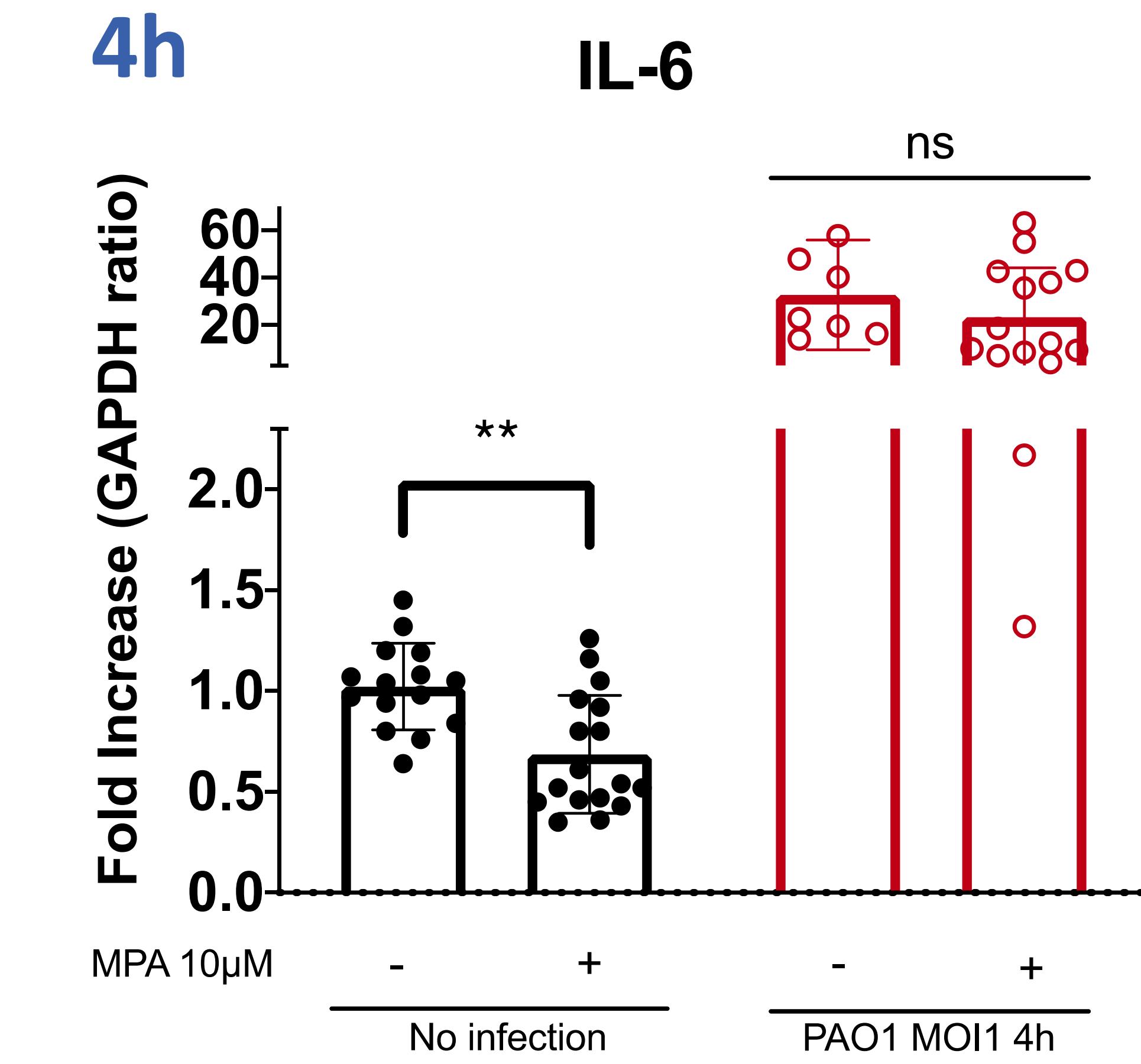
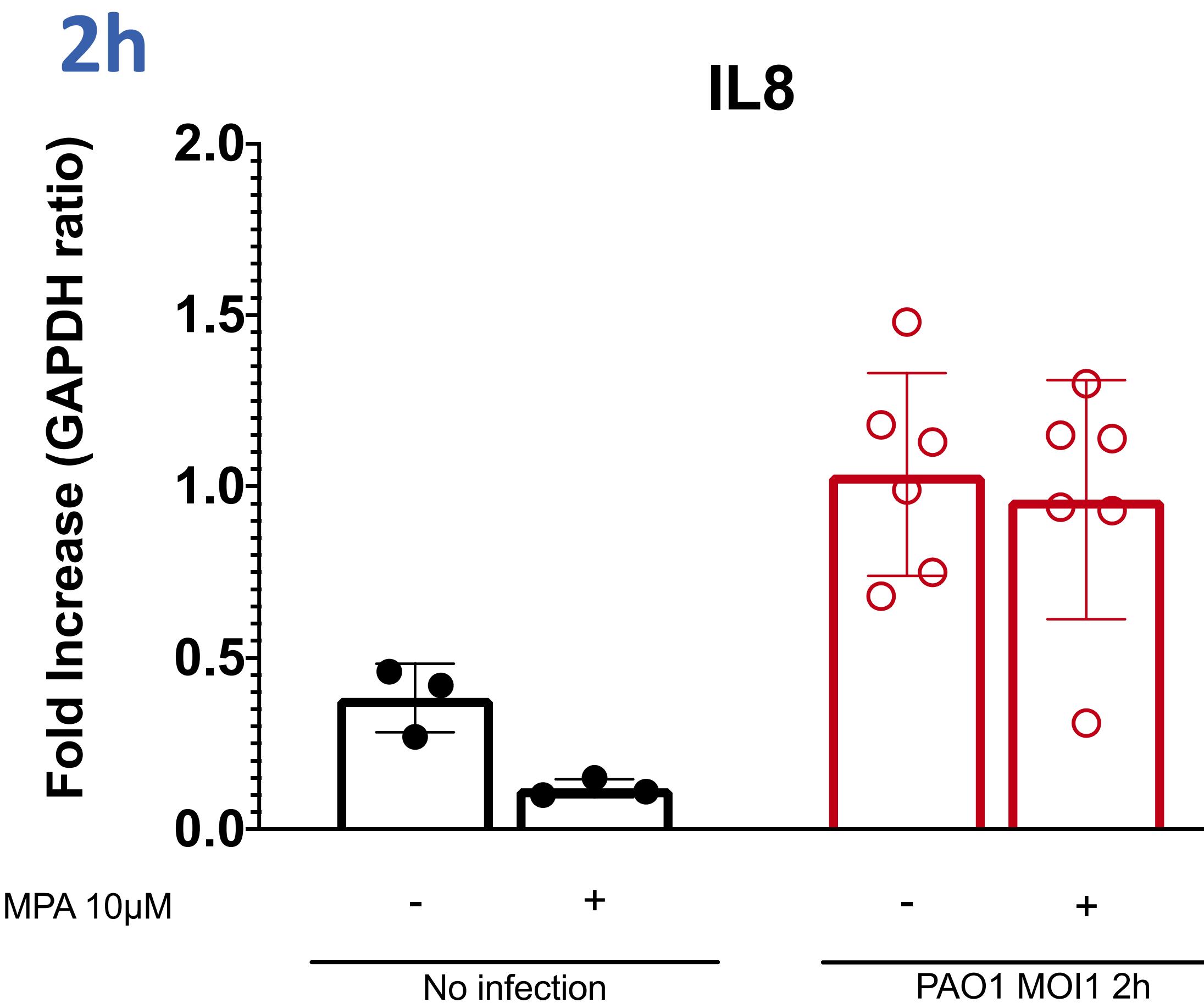
II existe peut-être une diminution de la réponse innée chez les patients traités par MMF

II. Réponse innée



Ces diminutions reposent sur une régulation transcriptionnelle pré-infection

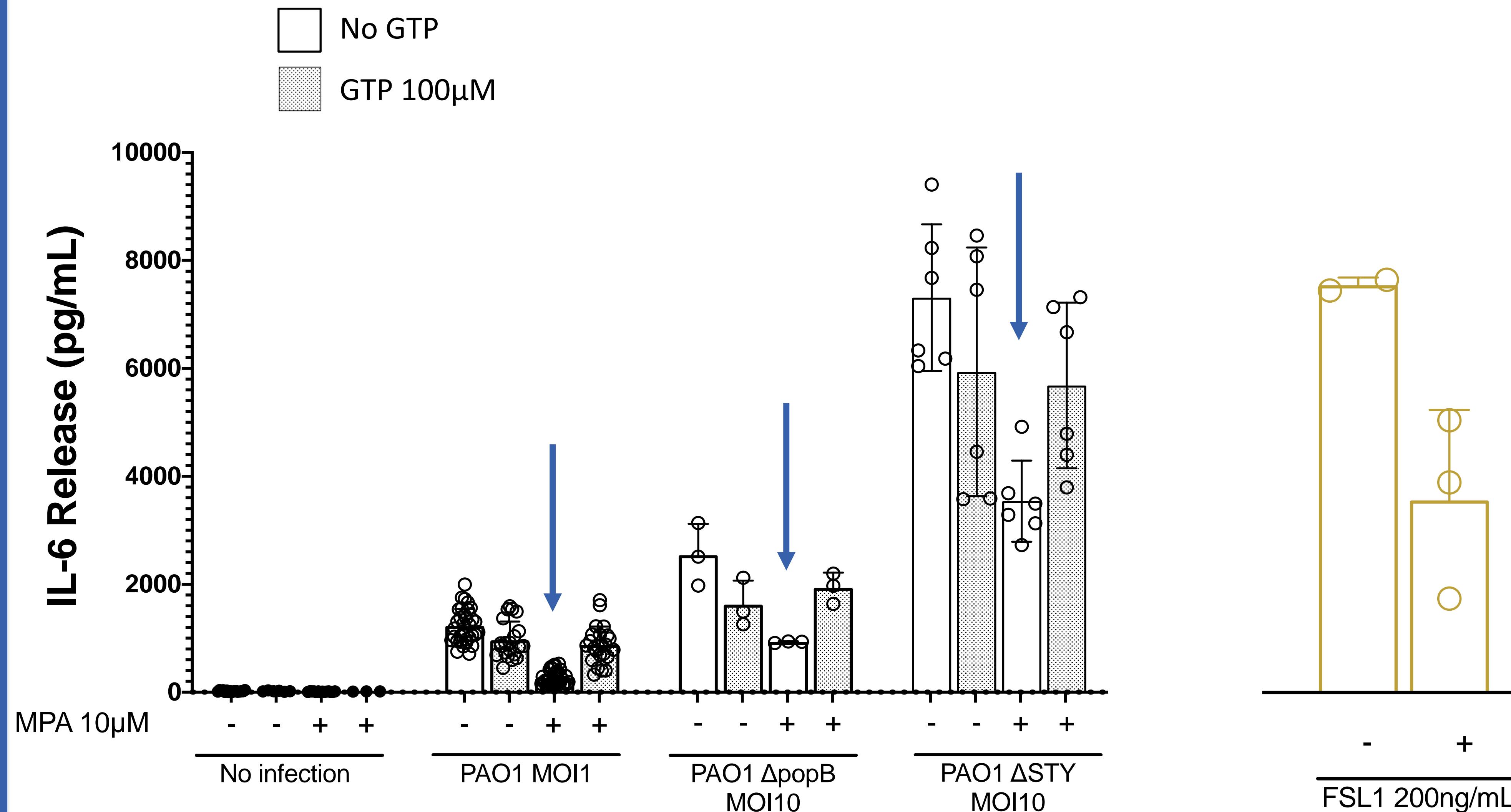
II. Réponse innée



n = 3-12 ; 1-4 independent experiments

Le MPA diminue la production d'IL-6 quel que soit le stimulus

II. Réponse innée



Conclusion Axe II

Le MPA diminue la production d'IL-6 et IL-8 épithéliale

- par un blocage de transcription avant stimulus
- entraînant donc un « retard à l'allumage »
- de façon pathogène-indépendante

Phénomène possiblement retrouvé *in vivo* voire chez les patients sous MMF

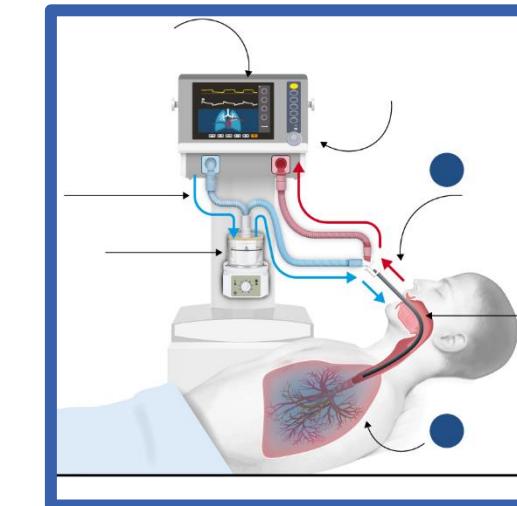
Suite Axe I

S'agit-il d'apoptose/nécrose ? Par quelle voie ?

- ⇒ RealTime Glo®
- ⇒ Seahorse®

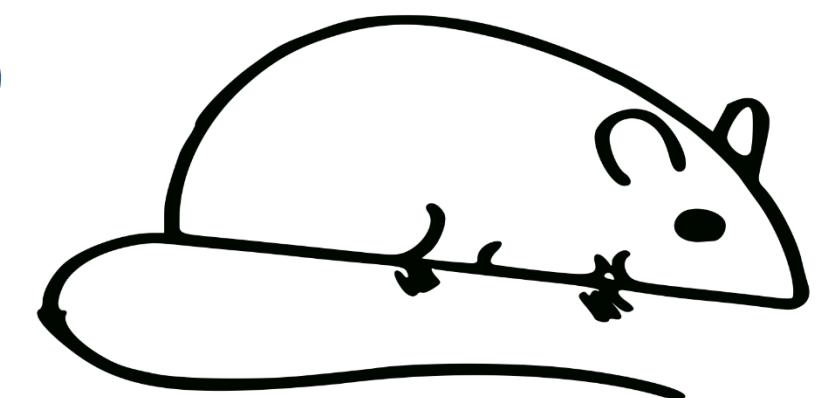
Majore-t-il la lésion épithéliale ?

- ⇒ Interface Air-Liquide
- ⇒ Histologie *in vivo*



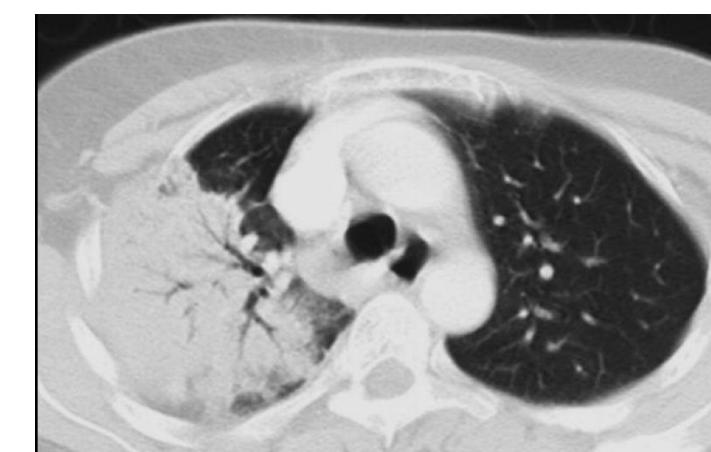
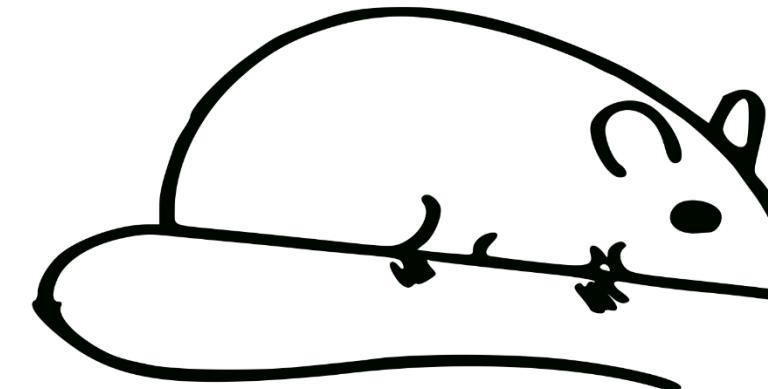
Diminue-t-il la survie ?

- ⇒ *In vivo*



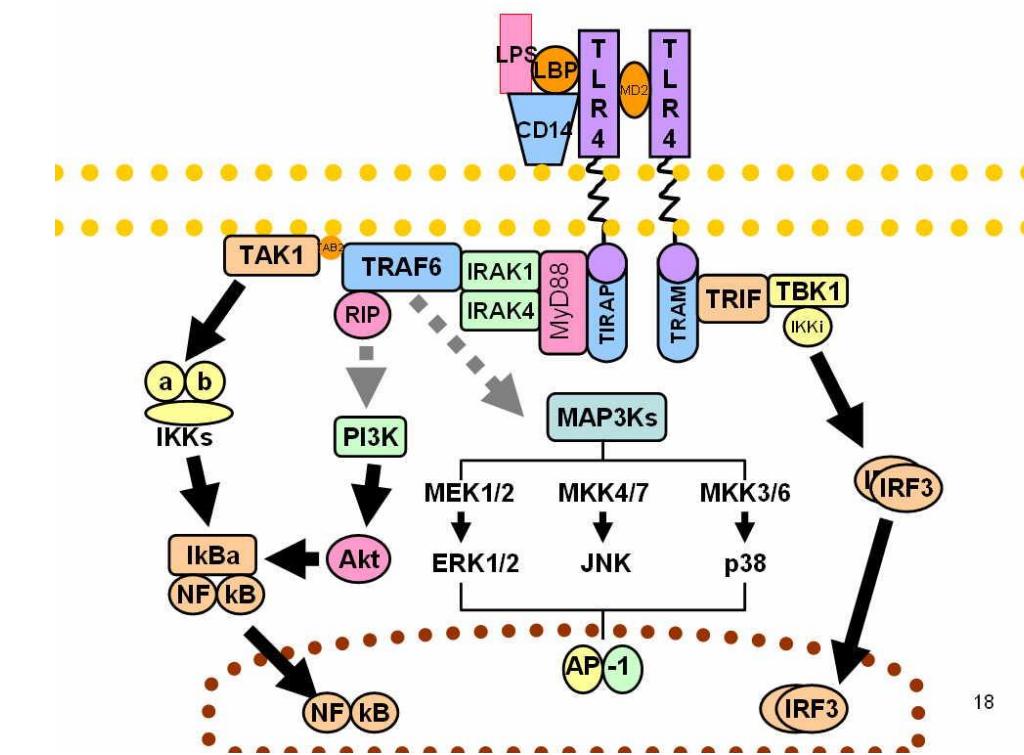
Suite Axe II

- Voies d'action de réduction transcriptionnelle :**
- BEAS-2B Δ MyD88, Δ TLR (CRISPR-Cas9)
 - Voie NF-KB
 - Transcriptome (Dr M.Figeac)



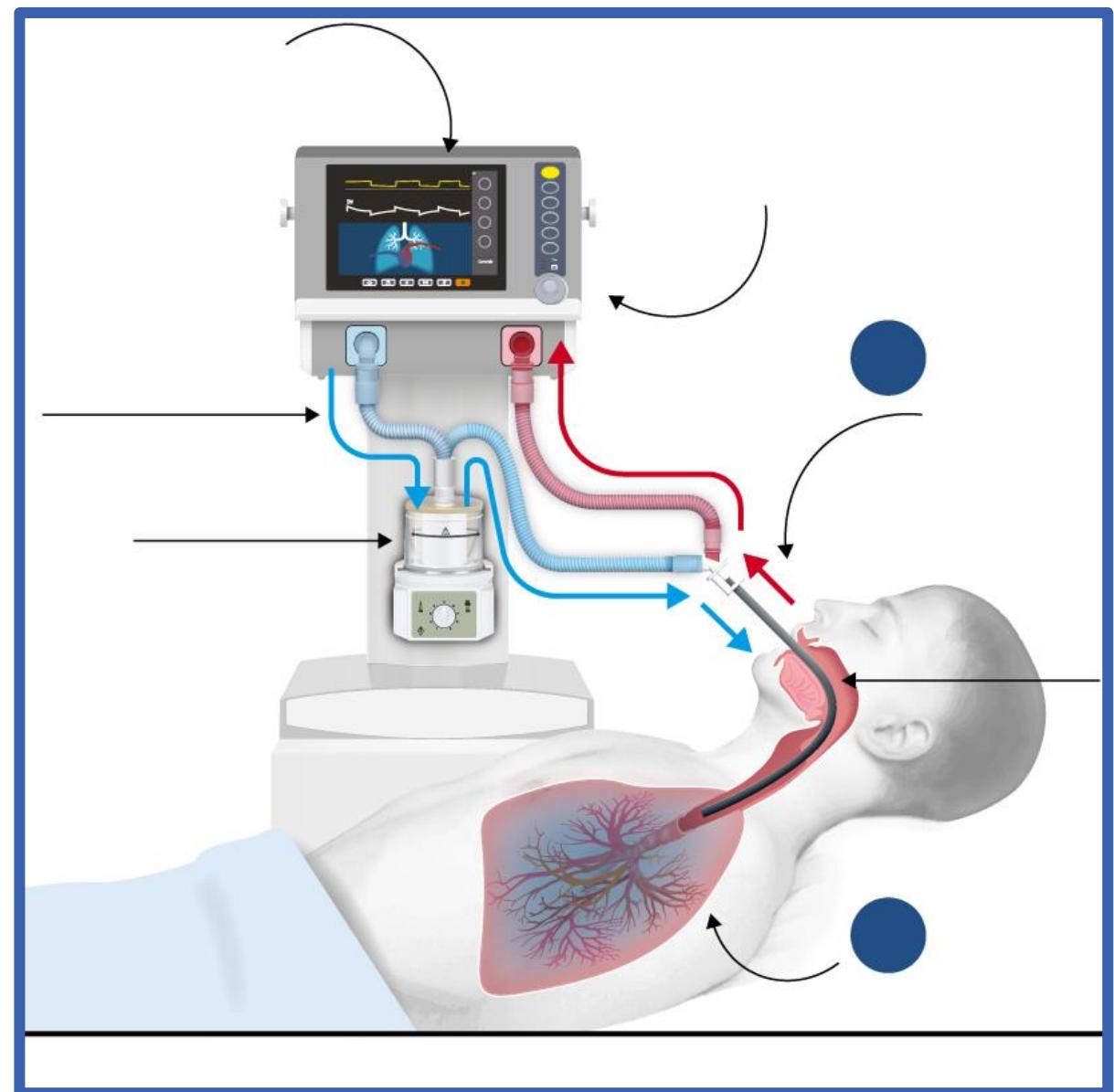
Continuité :

- *In vivo*
- Recueil patients



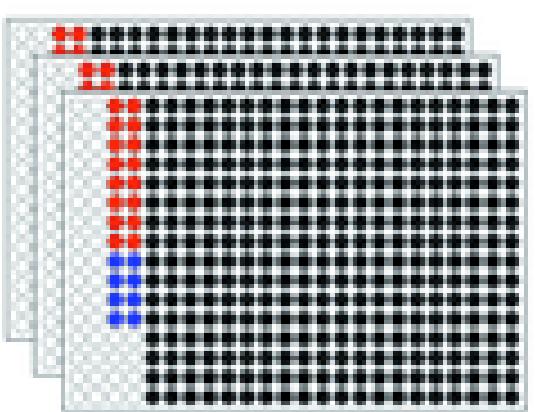
18

Conclusion - Projet



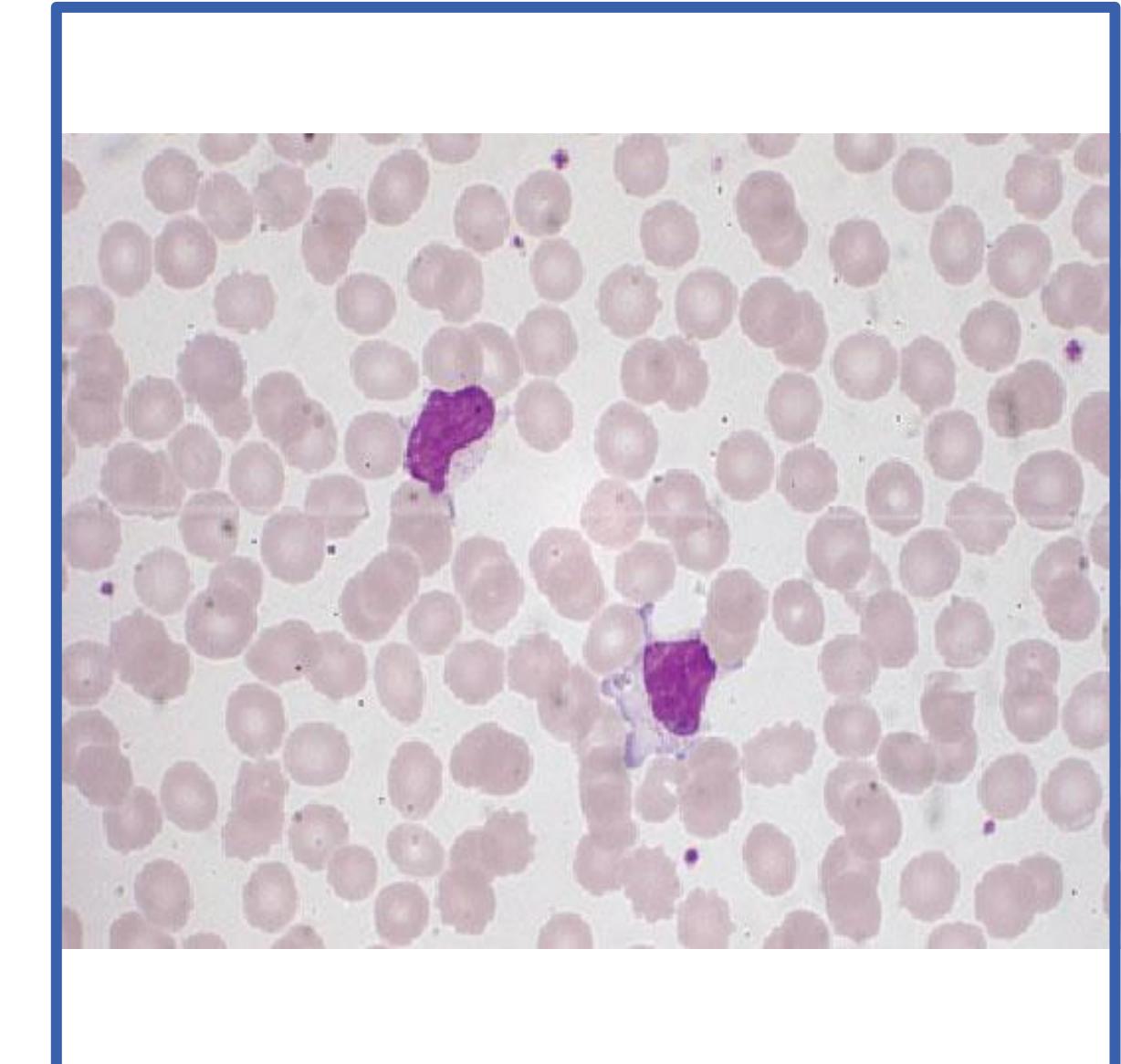
Aggravation de
cytotoxicité épithéliale
en réponse à PAO1

Pathogène-spécifique



Screening

Tacrolimus
Everolimus
Mycophenolate
Prednisone



Perte de réponse innée
Défaut de recrutement
PNN ?

Aspécifique

Discussion

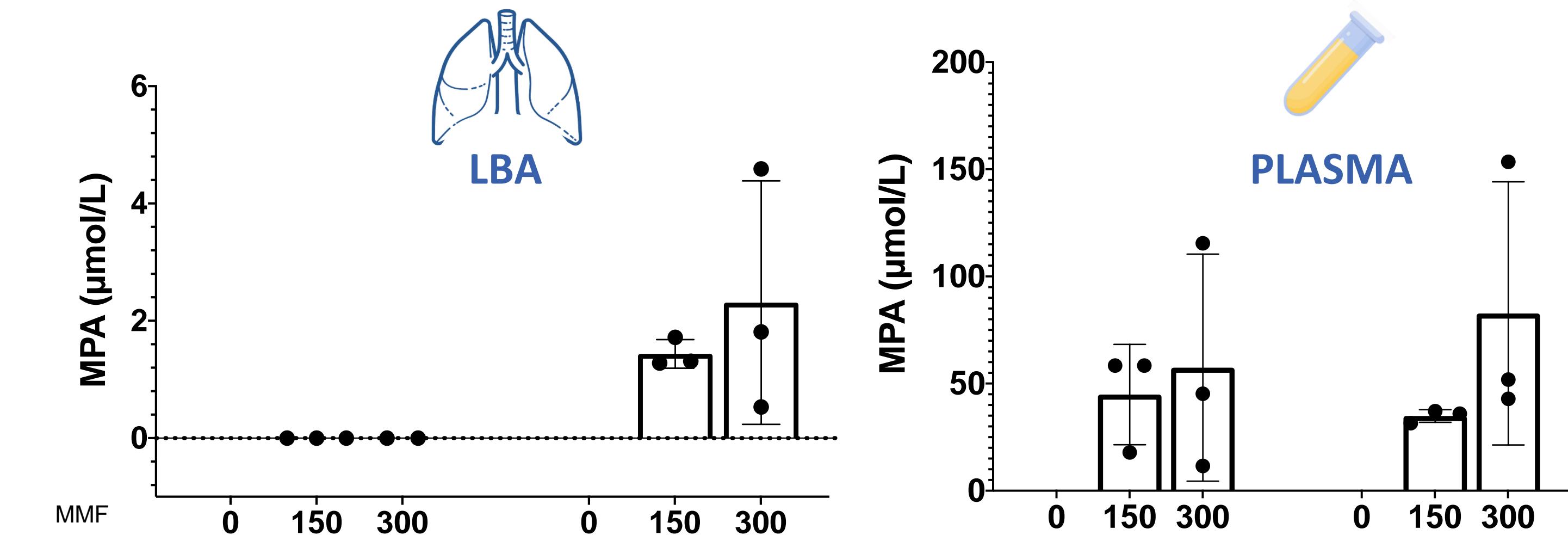
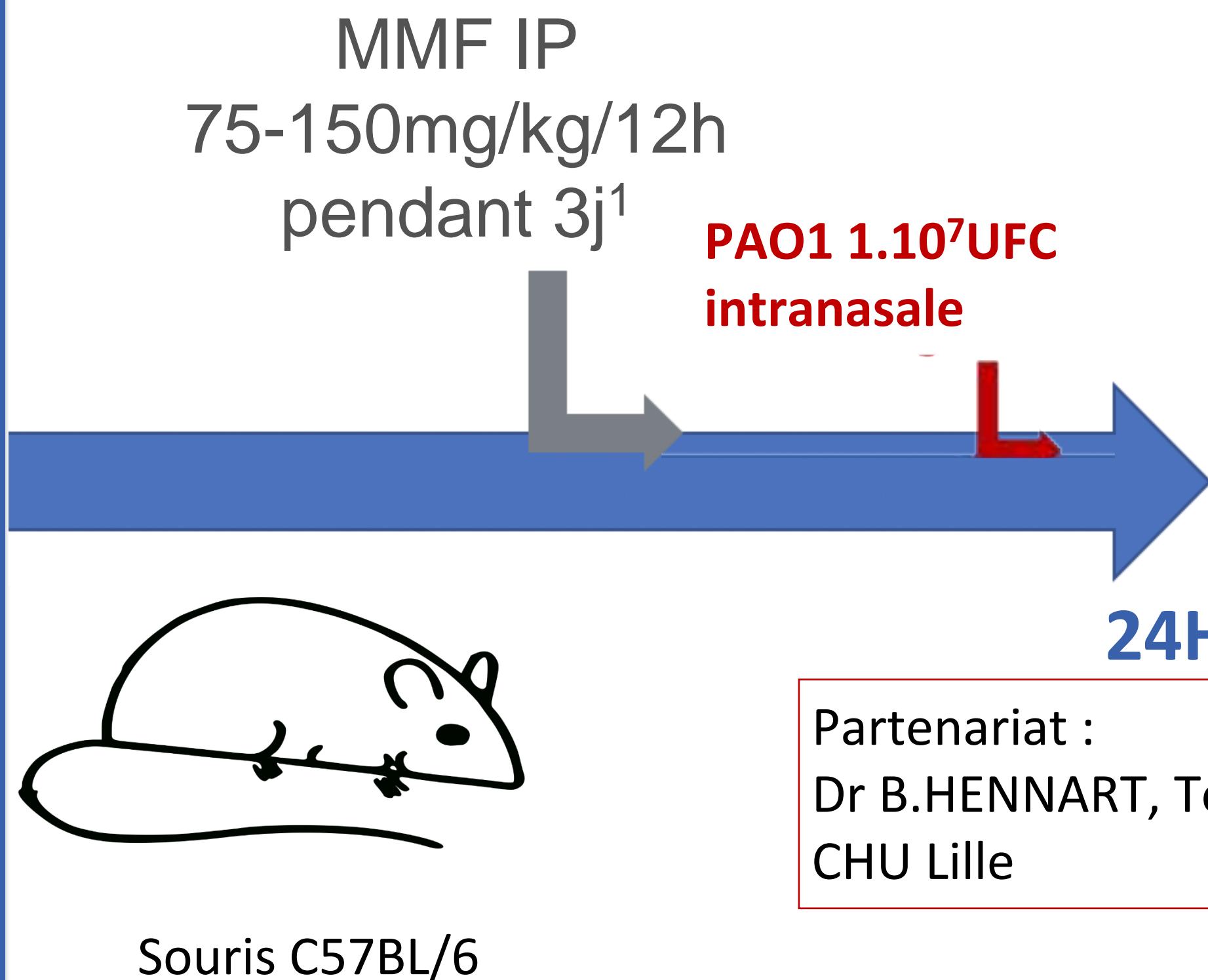
Merci !



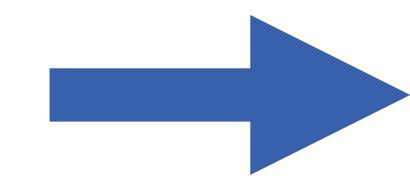
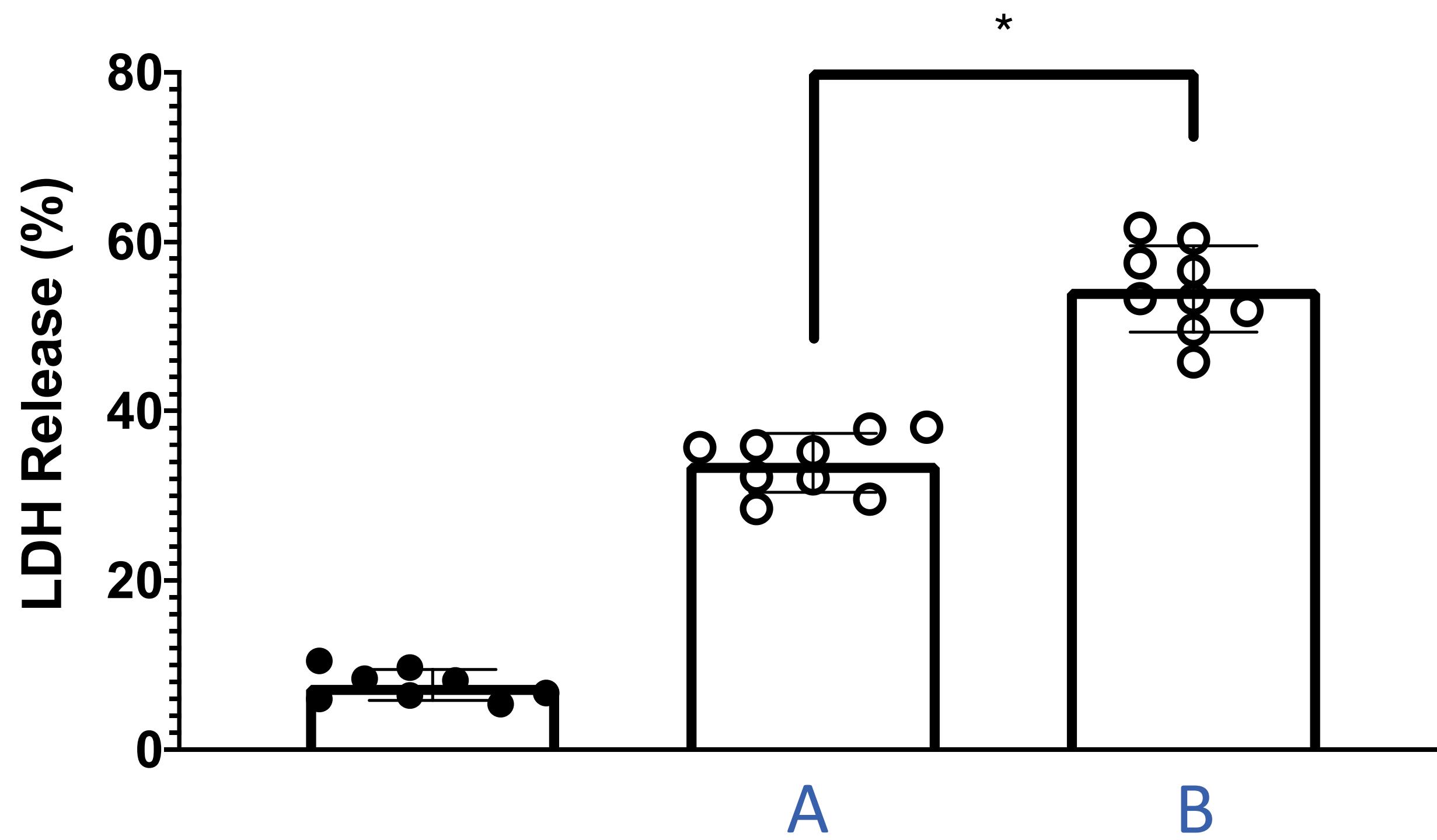
Opportunistic Infection
Immunity
Environment
& Lung Diseases



Validation du modèle d'immunosuppression de souris C57BL/6 par MMF



Mise au point – souche de PAO1



Génotypage



Mise au point – souche de PAO1

30	NC_002516	2669175	snp	G	C	C:142 G:0	CDS	-	2455/6474	819/2157	missense_va PA2400	pvdJ	pyoverdine biosynthesis protein PvdJ
31	NC_002516	2753522	ins	G	GC	GC:83 G:0							
32	NC_002516	2807693	del	TCGGCCAGC	T	T:90 TCGGCC	CDS	+	240/1044	80/347	frameshift_v PA2492	mexT	transcriptional regulator MexT
33	NC_002516	2807982	snp	T	A	A:101 T:0	CDS	+	514/1044	172/347	missense_va PA2492	mexT	transcriptional regulator MexT
34	NC_002516	3016844	ins	G	GC	GC:93 G:0							

missense_va PA2400	pvdJ	pyoverdine biosynthesis protein PvdJ
frameshift_v PA2492	mexT	transcriptional regulator MexT
missense_va PA2492	mexT	transcriptional regulator MexT

Remerciements : Dr Rémi Le Guern

⇒ souche B : MexT non-fonctionnel
phénotype P2

⇒ Utilisation souche A : phénotype P1

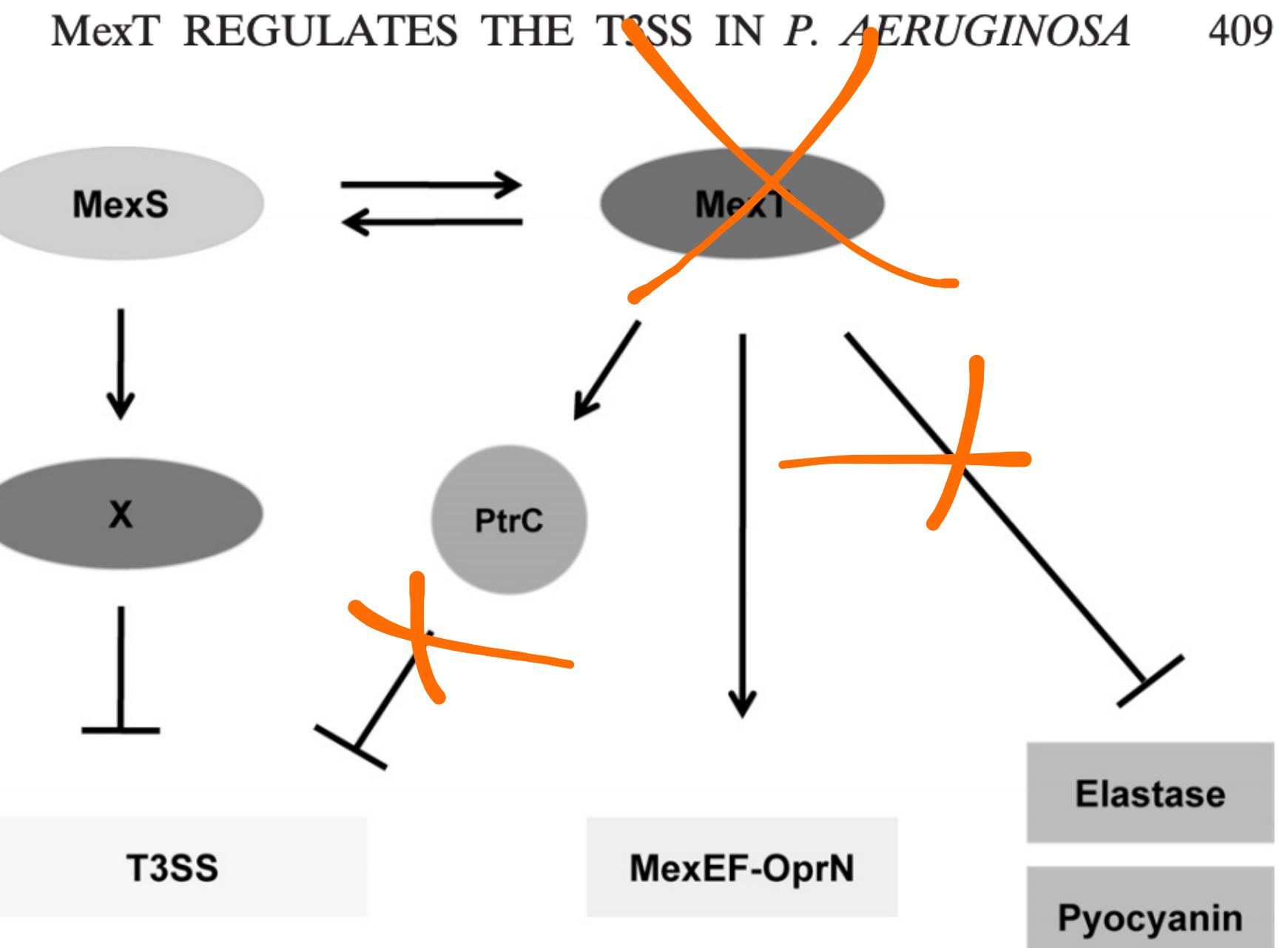
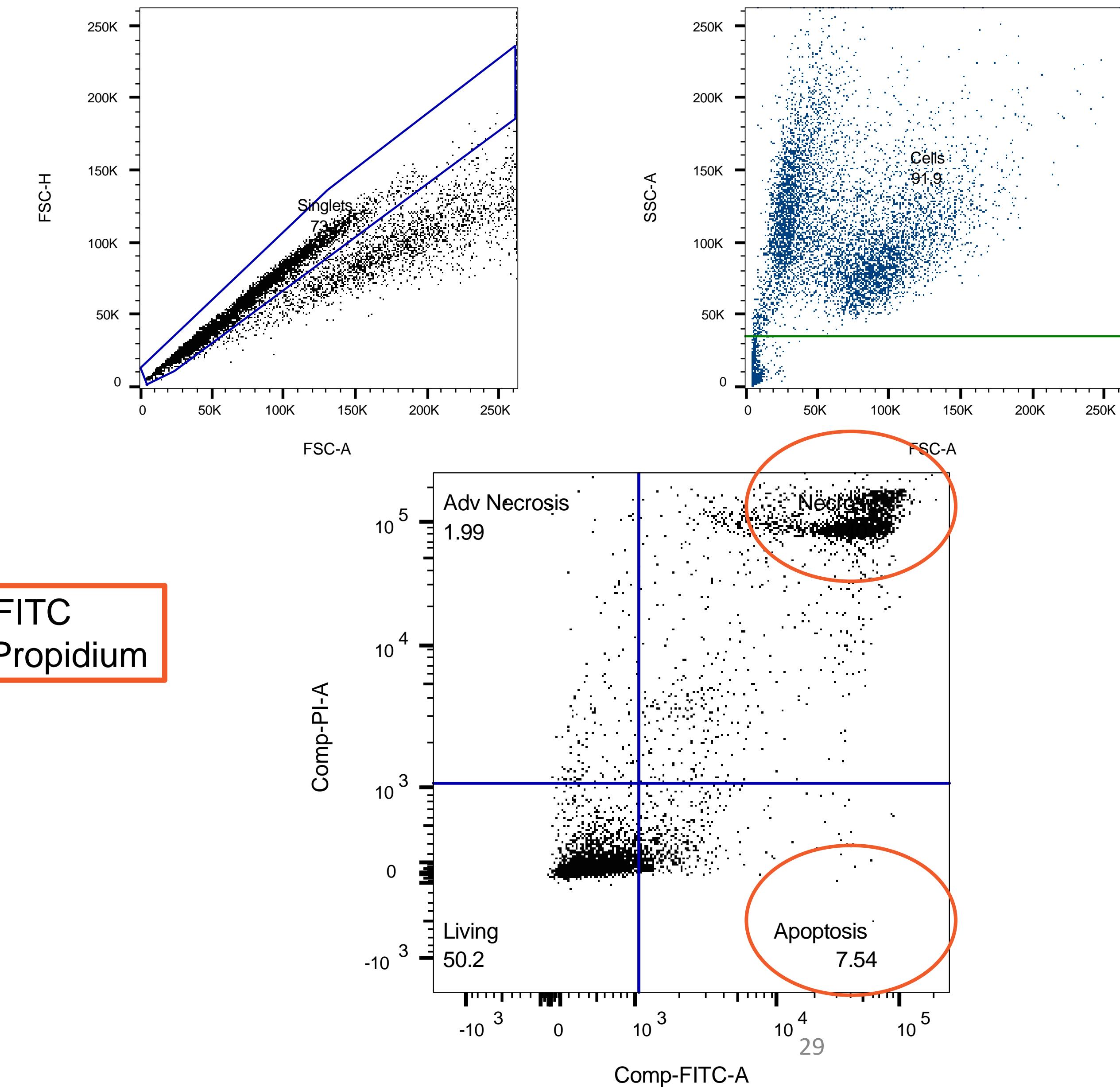
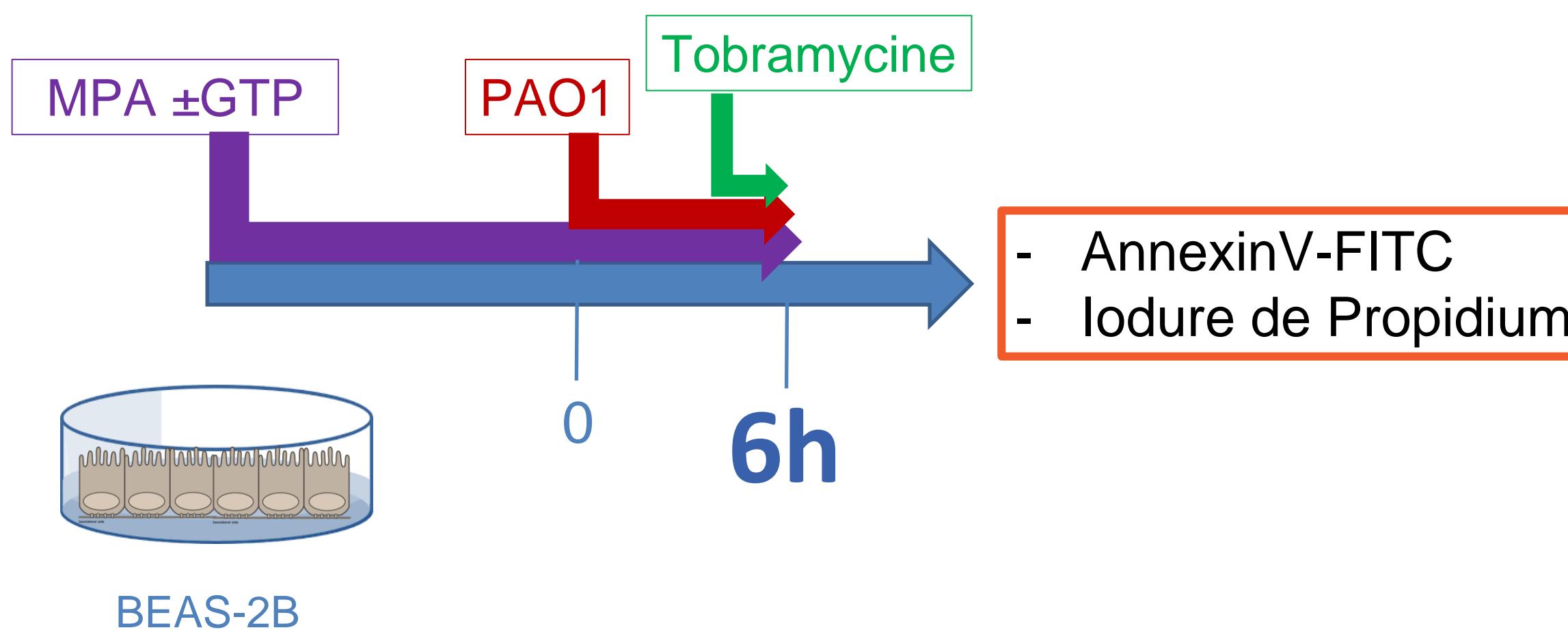


FIG. 10. Proposed model of MexS/MexT-mediated regulation of the type III secretion system (T3SS), the efflux pump (*mexEF oprN*), and elastase and pyocyanin production. “X” denotes a LysR-family transcriptional regulator that is activated by MexS and represses the T3SS directly or indirectly through a downstream repressor.

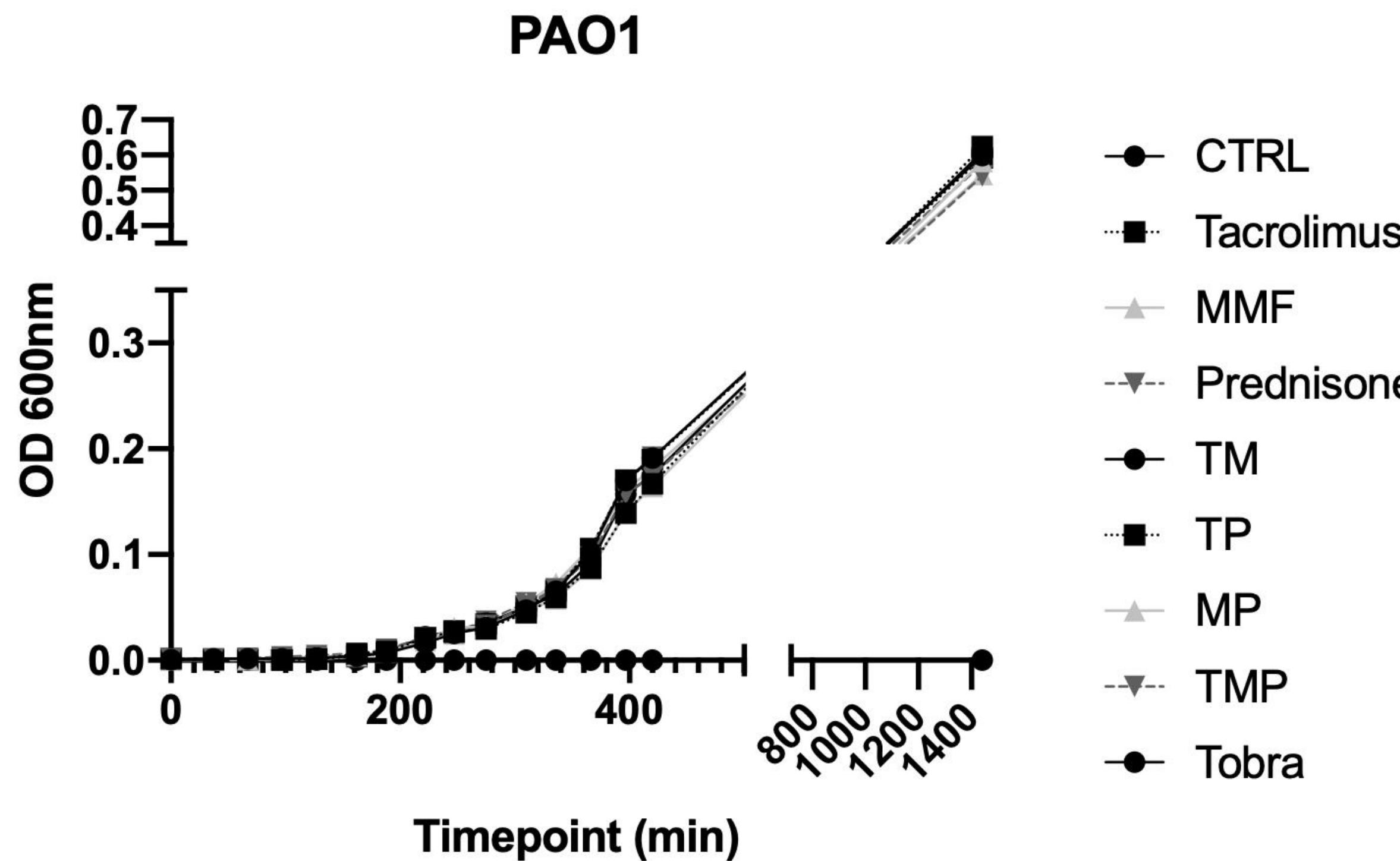
Jin, J Bacteriol 2011

Suite : nature de la cytotoxicité induite

I. Cytotoxicité



Effet des immunosuppresseurs sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*



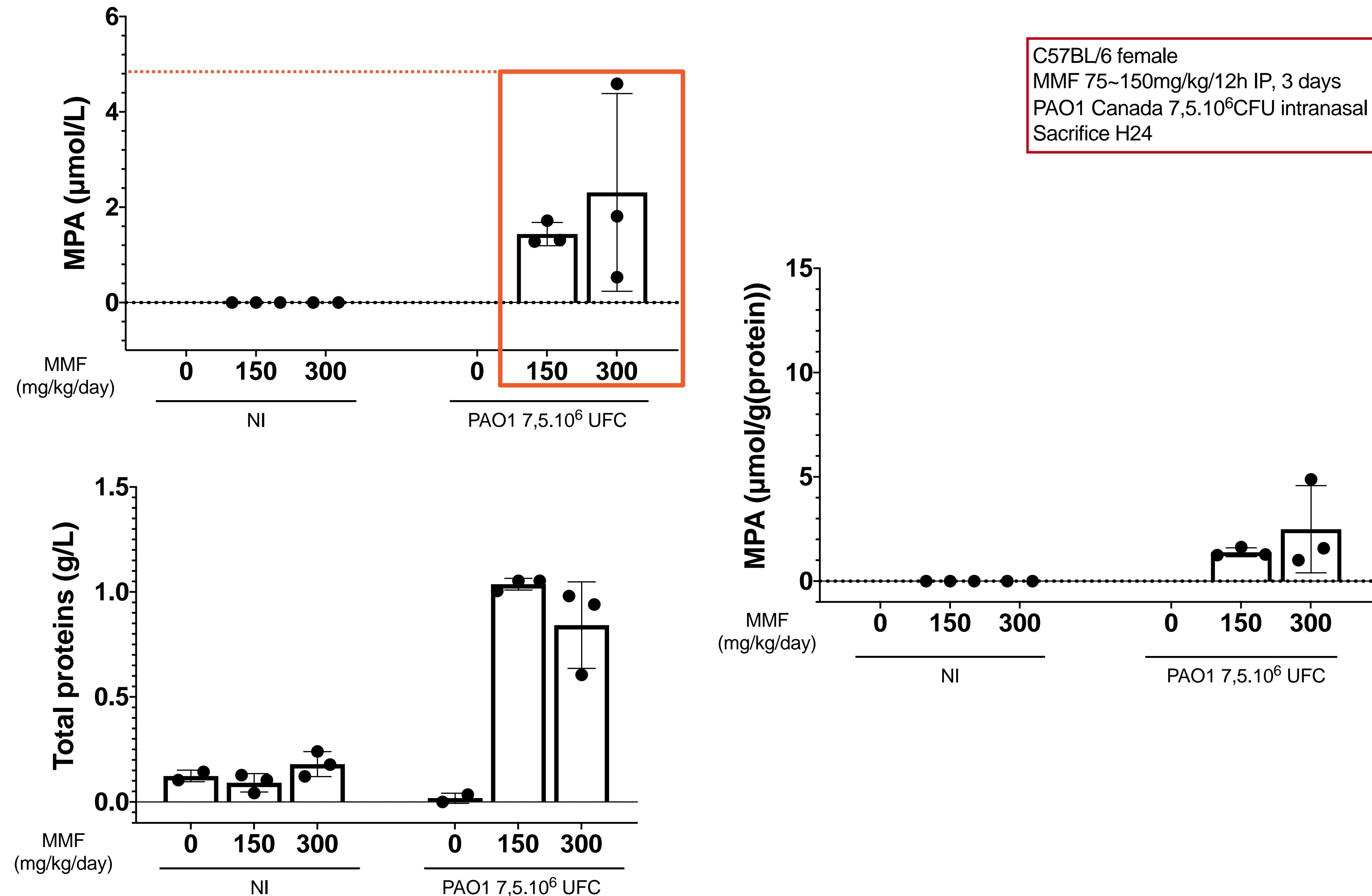
Evaluation de l'impact de différents immunosuppresseurs sur la croissance de *P. aeruginosa*

- Culture PAO1 en milieu liquide à 37°C et agitation continue
- Immunosuppresseurs dans le milieu seul ou en association

=> Pas d'effet sur étude préliminaire

IV. ANNEXES

Dosage MPA – LBA murins



La ribavirine n'est pas une alternative utilisable

IV. ANNEXES

