HAL
open science

Une souche de Pseudomonas aeruginosa morte mais métaboliquement active comme candidat vaccin induit une immunité humorale et cellulaire protectrice contre les infections pulmonaires à Pseudomonas aeruginosa

Elodie Meynet

To cite this version:

Elodie Meynet. Une souche de Pseudomonas aeruginosa morte mais métaboliquement active comme candidat vaccin induit une immunité humorale et cellulaire protectrice contre les infections pulmonaires à Pseudomonas aeruginosa. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01540634

HAL Id: dumas-01540634

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01540634

Submitted on 16 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR de Médecine
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE GRENOBLE ALPES
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année : 2017

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

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLÔME D'ETAT

Elodie MEYNET

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE*

Le : 9 Juin 2017

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : M. le professeur Christophe PISON

Membres :

Mme le docteur Audrey LE GOUËLLEC, directrice de Thèse

M. le professeur Bertrand TOUSSAINT

M. le professeur Olivier EPAULARD

M. le docteur Boubou CAMARA

**La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Jean Paul ROMANET**

Année 2016-2017

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APTEL Florent	Ophtalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie générale
PU-PH	BALOSSO Jacques	Radiothérapie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
PU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
MCU-PH	BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
MCU-PH	CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie

PU-PH	CHARLES Julie	Dermatologie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophtalmologie
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Oncologie
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
PU-PH	GUEBRE-EGZIABHER Fitsum	Néphrologie
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie, biologie moléculaire
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie

PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie - virologie
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU - PH	LE GOUËLLEC Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénéréologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
MCU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MC LEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Virologie

PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET Jean Paul	Ophtalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
MCU-PH	RUBIO Amandine	Pédiatrie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Réanimation
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale
MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale

A ma directrice de thèse, **Mme le docteur Audrey LE GOUELLEC**,

Je te remercie sincèrement pour ton aide et ton implication dans ce travail qui sans toi n'aurait pas été possible, à la fois durant mon année recherche mais également au cours de mon travail de thèse. Ton dynamisme et ton esprit vif m'ont permis d'apprendre beaucoup sur ce sujet que tu connais bien et qui te passionne, ainsi que sur ce milieu qu'est la recherche fondamentale que tu m'as permis de découvrir.

A mon président de thèse, **M. le professeur Christophe PISON**,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Merci pour tout ce que vous m'avez appris pendant ces 5 années en pneumologie, pour vos conseils et votre bienveillance.

A mes juges,

M. le professeur Bertrand TOUSSAINT, *Merci de m'avoir permis de faire partie de l'équipe TheREx et de m'investir dans ce projet. Merci également pour ta gentillesse, ton accessibilité, ton aide et tes conseils précieux durant toute mon année recherche*.

M. le docteur Boubou CAMARA, *Merci de m'avoir fait rencontrer Bertrand et Audrey pour ce joli projet qui te tient également à cœur. Merci pour tout ce que tu as pu m'apprendre en clinique et pour ta bonne humeur quotidienne.*

M. le professeur Olivier EPAULARD, *Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury et merci pour ta sympathie et ta disponibilité.*

Je remercie également tous les membres de l'équipe TheREx du laboratoire TIMC-IMAG et les membres d'APcure qui m'ont si bien accueillie parmi eux et qui m'ont aidé et rendu de nombreux services pendant cette année.

Je remercie particulièrement David Laurin et Habib Mohammed de l'EFS pour leur précieuse aide et leur grande gentillesse.

TABLE DES MATIERES

BREVET ET JOURNAL 8

ABREVIATIONS 9

INTRODUCTION 10

La mucoviscidose 10
Pseudomonas aeruginosa 12
Vaccination anti-*Pseudomonas aeruginosa* 13
Le concept de bactéries mortes mais métaboliquement actives : une assurance pour la vaccination 15
Objectif de l'étude 19

ARTICLE ORIGINAL 20
Killed but metabolically active *Pseudomonas aeruginosa* based-vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections

Abstract 21
Keywords 21
Introduction 22
Materials and Methods 24
Results and Discussion 29
Conclusion 34
Conflicts of interest 35
Acknowledgments 35
Author contributions 35
Figures 36
Supplementary data 43
References 46

RESULTATS COMPLEMENTAIRES 51

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 53

BIBLIOGRAPHIE 56

SERMENT D'HIPPOCRATE 59

RESUME 60

BREVET ET JOURNAL

Un dépôt de brevet Européen a été effectué le 16 Février 2017 sous l'appellation « souche vaccinale anti-*Pseudomonas aeruginosa* ».

Noms des inventeurs : Audrey Le Gouëllec, Elodie Meynet, Jean-Luc Lenormand, David Laurin, Bertrand Toussaint.

Numéro de dépôt attribué : EP17305173.1

L'article scientifique intitulé *« Killed but metabolically active Pseudomonas aeruginosa based-vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against Pseudomonas aeruginosa pulmonary infections »* est actuellement soumis au journal Vaccine.

Un deuxième travail d'écriture sur l'étude de la métabolomique chez des souris infectées par une souche sauvage de Pa et/ou vaccinées par Pa MMA (cf Résultats complémentaires), intitulé « *HR-MAS NMR-based metabolomics to predict survival of mice with pulmonary infections and to identify specific biomarkers »,* est en cours de rédaction.

ABREVIATIONS

MMA	: Mort mais Métaboliquement Actif
CFTR	: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
Pa	: *Pseudomonas aeruginosa*
SST3	: Système de Sécrétion de Type 3
IPTG	: IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside
F508del	: délétion d'une phénylalanine (F) en position 508 de la protéine CFTR
Cl-	: Chlorure
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
UVA	: UltraViolet de type A
CHA	: souche de *Pseudomonas aeruginosa* mucoïde sauvage (isolée d'un patient atteint de mucoviscidose du CHU de Grenoble)
OSTAB	: souche de *Pseudomonas aeruginosa* CHA délétée pour les exotoxines S et T, et délétée pour les gènes *uvrA et uvrB* donc rendue sensible au traitement photochimique
CPA	: Cellule Présentatrice d'Antigènes
pEi	: plasmide pEi
PBS	: Phosphate-Buffered Saline (tampon phosphate salin)

INTRODUCTION

La mucoviscidose

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques rares dans la population caucasienne, avec 1 enfant touché pour 2500 naissances en Europe et en Amérique du Nord. C'est une maladie grave dont on ne guérit pas. La France compte près de 6500 patients (1). Bien que l'espérance de vie des individus touchés ait augmentée ces dernières années atteignant les 50 ans, notamment grâce à l'organisation des soins et l'avènement récent des nouvelles thérapies protéiques ciblées sur les mutations, la morbidité et la mortalité liées à la mucoviscidose restent élevées (1).

Il s'agit d'une maladie génétique autosomique récessive due à des mutations du gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) présent au niveau du bras long du chromosome 7 (7q31). Six classes de mutations de ce gène ont été décrites, conduisant soit à une absence totale ou partielle de la protéine (classes I, II, V), soit à une anomalie de fonction de la protéine (classes III, IV, VI) (2). Plus de 2000 mutations sont décrites à ce jour parmi lesquelles la plus fréquente est la mutation F508del. Elle est présente chez plus de 80% des malades en France dont 42% sous forme homozygote (deux copies) (1). D'un patient à l'autre, on observe une grande diversité d'expression clinique, tant pour l'âge d'apparition des premiers symptômes que pour la sévérité de l'évolution ; la sévérité de l'atteinte respiratoire conditionne le pronostic vital dans la majorité des cas.

La protéine CFTR, normalement présente au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales (arbre trachéo-bronchique, canaux biliaires et pancréatiques, cryptes intestinales, tubules rénaux, appareil génital, glandes sudoripares), qui intervient dans la régulation du transport des ions Cl^- au niveau de la membrane cellulaire, se comporte comme un canal chlorure (Cl-) qui fait sortir les ions Cl- de la cellule. Ce canal étant défectueux dans la mucoviscidose, la rétention dans la cellule des ions Cl- empêche la sortie passive concomitante d'eau et entraine une déshydratation des sécrétions rendant ainsi le mucus épais et visqueux à la partie apicale de la cellule (Figure 1).

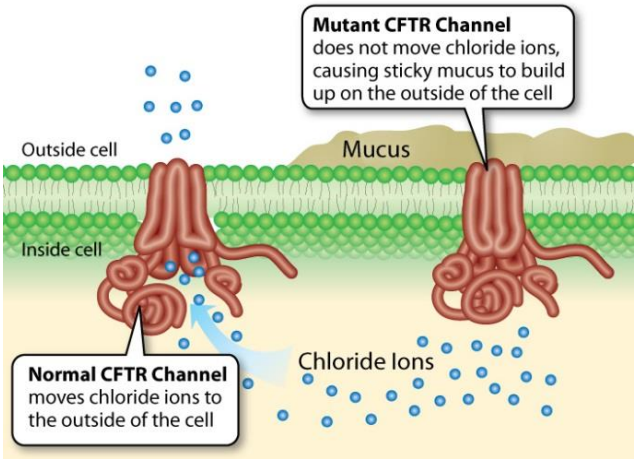


Figure 1. Protéine CFTR défectueuse dans la mucoviscidose à l'origine d'un mucus épaissit.

La viscosité anormalement élevée du mucus, en réduisant l'efficacité de la clairance muco-ciliaire (mécanisme par lequel les particules inhalées supérieures à une certaine taille sont propulsées vers les voies digestives), permet l'adhérence des bactéries à l'épithélium bronchique et favorise ainsi les infections endobronchiques chez les patients atteints de mucoviscidose dès leur plus jeune âge. La répétition des infections respiratoires aiguës conduit à des variations quantitatives mais surtout qualitatives du microbiote des voies aériennes inférieures (3), ainsi qu'à une inflammation chronique des bronches aboutissant progressivement à leur remaniement et leur obstruction (4). La dysbiose ainsi créée contribue à l'émergence de bactéries pathogènes opportunistes présentes à l'état physiologique au sein du microbiote concerné, tel que *Pseudomonas aeruginosa*.

***Pseudomonas aeruginosa* (Pa)**

Pa n'est pas un commensal habituel des voies aériennes de l'homme. En effet, le taux de portage oropharyngé est généralement inférieur à 5% (5). Pourtant dans la mucoviscidose Pa est de loin l'agent pathogène le plus important (Figure 2) avec

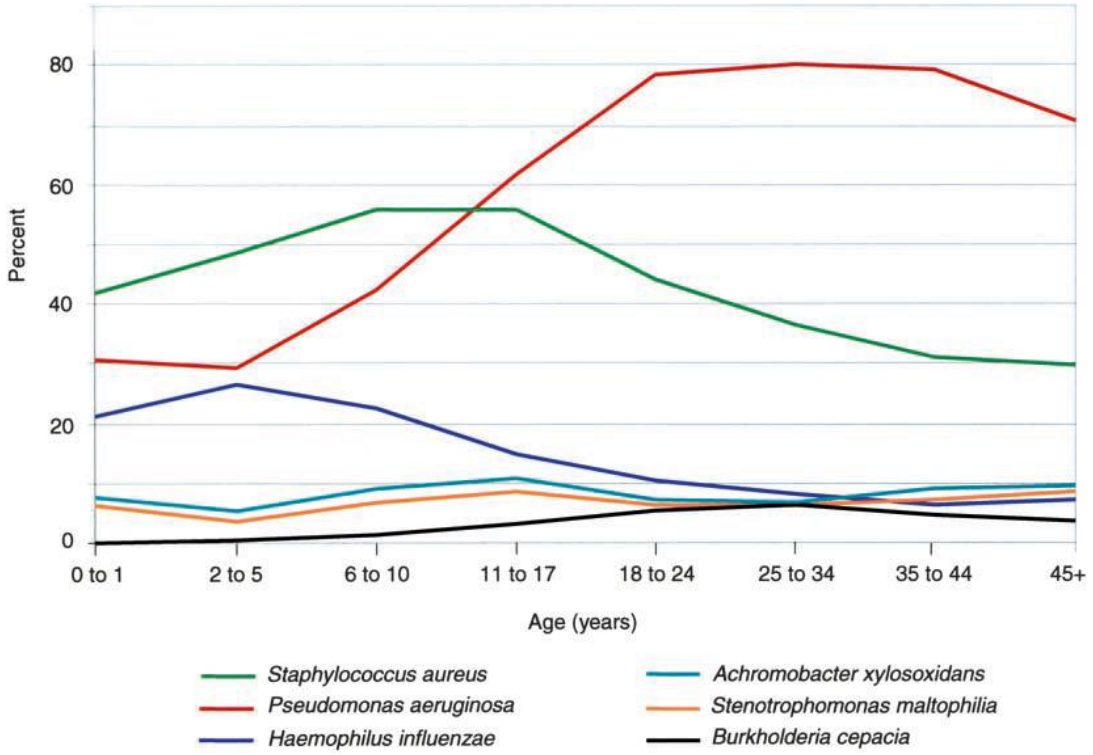


Figure 2. Agents infectieux retrouvés chez les patients atteints de mucoviscidose en fonction de l'âge. D'après Gibson et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. Oct 15, 2003.

jusqu'à 80% de patients adultes infectés au moins une fois pendant une période d'un an (6). Son acquisition est considérée comme un tournant évolutif dans l'histoire de la maladie et associée à un mauvais pronostic clinique (7–9). Il s'agit d'un bacille Gram négatif opportuniste, aérobie, ubiquitaire vivant dans les sols et en milieu humide. Son très large génome de 6,3 Mpb lui offre la possibilité d'une capacité extraordinaire à s'adapter à de multiples environnements différents, y compris les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose.

L'éradication de cette bactérie est difficile du fait de l'acquisition de mécanismes de résistance aux antibiotiques d'une part, et de sa capacité à s'adapter à son hôte d'autre part. Alors que les isolats précoces de Pa chez ces malades sont très semblables aux isolats environnementaux dans leur phénotype, les isolats retrouvés plus tardivement sont plus résistants aux antibiotiques et fréquemment mucoïdes (10,11). L'émergence de ces colonies mucoïdes est causée par l'hyperproduction d'alginate, considéré comme un marqueur de transition vers une infection chronique (10). Le biofilm, entretenu par les signaux de quorum-sensing (signaux de cellule-à-cellule basés sur la notion de « perception du quota »), protège efficacement les bactéries des cellules phagocytaires très abondantes dans les sécrétions bronchiques et diminue sensiblement l'efficacité bactéricide des antibiotiques (7,12,13). Ainsi, l'alginate favorise le développement d'une sous-population bactérienne tolérante aux antibiotiques et entraine l'apparition d'infections chroniques à Pa chez ces patients.

A l'heure actuelle où Pa est le 2ème agent pathogène à combattre du fait d'un niveau de résistance critique aux antibiotiques (14), il semble indispensable de s'orienter vers le développement d'une stratégie vaccinale. Cela permettrait d'une part une épargne considérable en antibiotiques et ainsi une diminution de la dysbiose en maintenant une composition optimale du microbiote pulmonaire. Cela permettrait d'autre part de prévenir la primo-infection à Pa chez les jeunes patients atteints de mucoviscidose et d'éviter ainsi les colonisations et infections chroniques.

Vaccination anti-*Pseudomonas aeruginosa*

Malgré plus de 40 ans de recherche et d'essais cliniques jusqu'en phase III, aucun vaccin n'est actuellement disponible sur le marché (15–21).

Des vaccins acellulaires recombinants ciblant différents antigènes de Pa ont initialement été testés (18,21). Ceux ciblant le lipopolysaccharide ont été montré comme immunogènes et protecteurs mais uniquement vis-à-vis de souches infectantes identiques aux souches vaccinales testées du fait d'une grande hétérogénéité, avec un coût et une complexité de production importante, et non retenus chez l'homme du fait de leur toxicité (22–24). Un vaccin ciblant le flagelle a montré une faible mais significative diminution des infections à Pa dans une grande étude randomisée de 2007 (25), mais la compagnie impliquée dans la production de ce vaccin (Autriche) a stoppé la production avant la fin de l'étude (18). D'autres vaccins anti-flagelle ont été testés mais abandonnés du fait de l'apparition de souches de Pa sans flagelle (26). Les vaccins ciblant les protéines de la membrane externe OprF et OprI testés jusqu'en phase II sont prometteurs du fait de leur forte immunogénicité, de leur expression quasi constitutive et leur lien avec la virulence (27), et du peu d'effets indésirables qu'ils entrainent, mais des études cliniques contrôlées supplémentaires sont requises (28). Des vaccins ciblant les protéines PcrV du système de sécrétion de type 3 (SST3) augmentent la survie des souris infectées par Pa et diminue l'inflammation et les lésions pulmonaires liées à ces infections (29), mais n'ont pas encore été testés en clinique. Des vaccins basés sur des vecteurs viraux tel que OprF/adénovirus engendrent une réponse humorale spécifique et protectrice chez la souris mais n'ont pas encore été testés chez l'homme (30). Quant aux vaccins tués, ils sont sûres d'utilisation et permettent d'engendrer une réponse immune contre de nombreux antigènes, mais n'entrainent pas d'immunité à long terme (31).

De ce fait, différentes équipes se sont tournées vers le développement de vaccins vivants atténués afin de se rapprocher au mieux de la grande variabilité antigénique

de Pa. Ces vaccins se sont montrés particulièrement intéressants de par la forte et vaste réponse immune qu'ils engendrent, à la fois humorale et cellulaire (32–35). Il apparait en effet que l'activation de la voie Th17 est indispensable pour obtenir l'éradication de Pa (36), et des protéines de Pa ont été identifiées comme pourvoyeuses d'une sécrétion importante d'IL-17 telles que PopB, FpvA, FptA, OprL and PilQ (35). Ces données suggèrent donc l'intérêt de développer un vaccin candidat impliquant de multiples effecteurs de l'immunité, parmi lesquels la voie Th17, en plus d'une production d'anticorps dirigés contre certains antigènes spécifiques de Pa. Mais de nos jours ces vaccins vivants atténués conservent une virulence résiduelle non compatible avec leur utilisation en vaccination humaine.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à une stratégie d'atténuation encore plus sûre de ces formes atténuées de pathogènes virulents : les bactéries Mortes mais Métaboliquement Actives (MMA).

Le concept de bactéries mortes mais métaboliquement actives : une assurance pour la vaccination

Il s'agit d'une stratégie d'atténuation de la bactérie vivante par un traitement photochimique qui la rend « morte » puisque incapable de se répliquer chez son hôte, tout en restant « métaboliquement active » puisque ses gènes peuvent encore être exprimés ce qui lui permet de conserver ses propriétés essentielles de bactérie vivante et ainsi d'exprimer des effecteurs qui pourront correctement stimuler le système immunitaire. Ce traitement pourrait donc être à la fois un gage d'assurance concernant le risque infectieux et un gage d'efficacité de la réponse immune induite.

La première bactérie MMA comme vecteur vaccinal a été décrite par Brockstedt *et al.* en 2005 avec l'utilisation de *Listeria monocytogenes* (37). La délétion des gènes *uvr A* et *B*, impliqués dans les systèmes de réparation de l'ADN, rend la bactérie sensible à l'amotosalen (38). Cette molécule crée des pontages au niveau de l'ADN de la bactérie rendus permanents après traitement aux UVA ce qui empêchent la bactérie de se répliquer (39) (Figure 3).

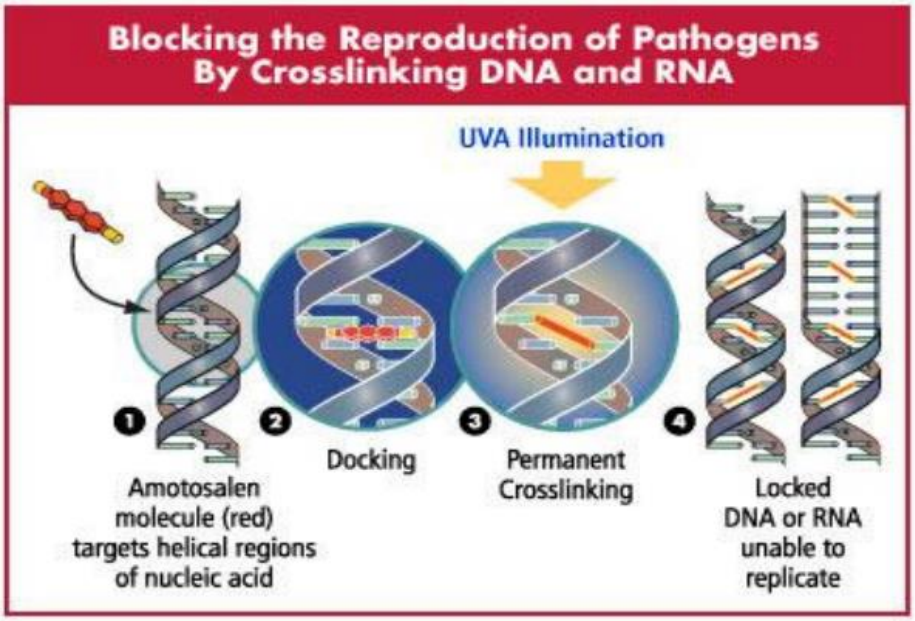


Figure 3. Méthode d'atténuation de la bactérie MMA.

Il a été démontré que cette approche vaccinale innovante basée sur la souche *Listeria monocytogenes* suscite une réponse cellulaire T qui est protectrice dans un modèle murin d'infection et qui fournit un bénéfice thérapeutique dans un modèle murin de cancer (40). D'autres études ont décrit l'utilisation du concept de bactéries MMA comme vaccins dérivés de formes atténuées de pathogènes virulents, tels que pour la leishmaniose viscérale et le bacille de l'anthrax (41,42).

Cette technologie pourrait donc être appliquée à la souche Pa et envisagée comme un « nouveau paradigme vaccinal » dans lequel l'innocuité d'un vaccin inerte et la puissance d'un vaccin vivant seraient combinés.

Un mutant de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), délété pour les gènes *uvrAB* (Δ*uvrAB)* nommé OSTAB, dans lequel la plupart des exotoxines de Pa sont naturellement absentes (ExoU) ou supprimées par délétion de gènes (ΔexoS, ΔexoT) a déjà été développé au laboratoire et breveté (WO2013087667 A1) (43). Il a été démontré que Pa MMA est capable de délivrer *in vitro* différents antigènes aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) via son SST3 avec une cytotoxicité considérablement diminuée au regard des CPA comparé à un simple vaccin vivant atténué (43). De plus, il a été montré dans un modèle tumoral que Pa MMA conserve sa capacité à induire une réponse immune cellulaire cytotoxique spécifique des antigènes de la tumeur (43,44) et une réponse mémoire à long terme (45).

Dans cette étude, nous rapportons la construction d'un vaccin Pa MMA à partir de la souche OSTAB modifiée par ingénierie avec le plasmide pEi pour forcer l'expression du SST3 à la surface de la bactérie dans le but d'induire une immunisation et une protection plus importante contre le pathogène Pa. Le SST3 est un des principaux facteurs de virulence de Pa ressemblant à une micro seringue insérée dans la membrane de la bactérie (Figure 4) et capable d'injecter différentes toxines dans les cellules hôtes. Il a été montré récemment que cette micro seringue pouvait être « détournée » pour injecter des protéines d'intérêt (44). C'est ainsi que le plasmide pEi qui contient le gène *exsA* codant le principal activateur du SST3, sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG (ptaq), permet de stimuler la synthèse du SST3 à la surface de la bactérie Pa MMA grâce à l'adjonction d'IPTG lors de la culture bactérienne (Figure 4).

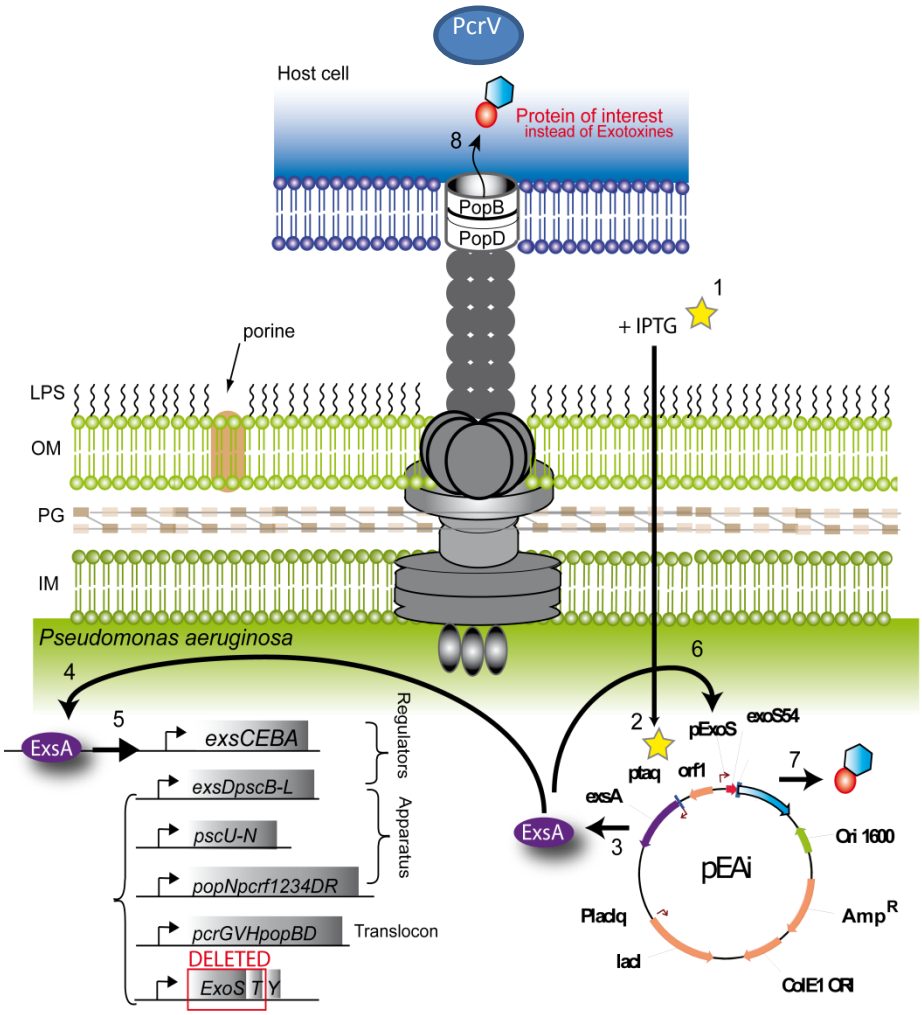
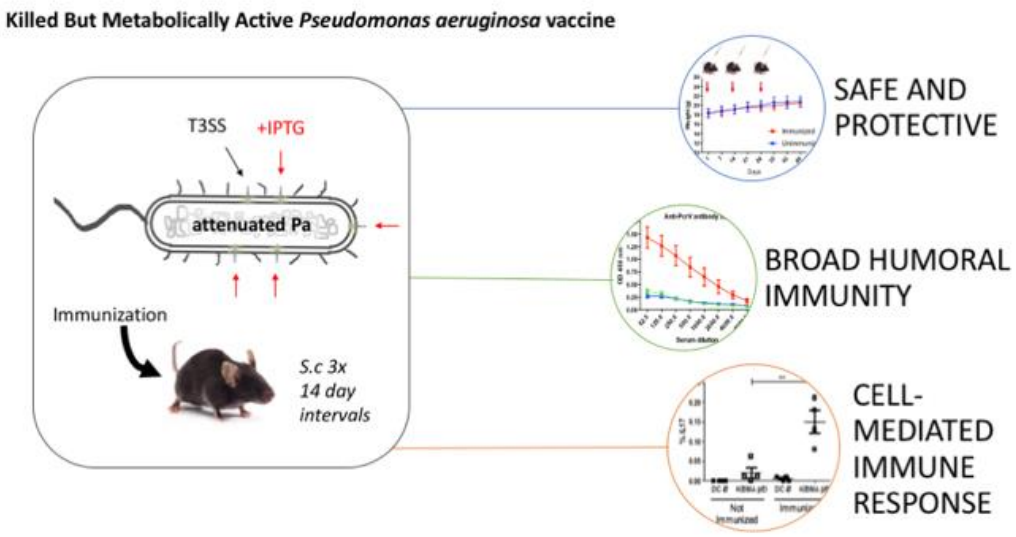


Figure 4. Système de sécrétion de type 3 de Pseudomonas aeruginosa ressemblant à une « micro seringue » avec à son sommet les protéines PcrV et PopB. La méthode d'atténuation MMA a été appliquée sur la souche OSTAB transformée avec le plasmide pEi afin de détourner cette « micro seringue » pour délivrer des antigènes d'intérêt dans la cellule hôte. L'ajout d'IPTG pendant la culture bactérienne permet de booster le SST3 à la surface de la bactérie.
OM: outside membrane; IM: inside membrane; PG: proteoglycan; LPS: lipopolysaccharide.

Objectif de l'étude

Nous souhaitons démontrer ici que le vaccin Pa MMA + IPTG est sûre d'utilisation et confère une immunité protectrice humorale et cellulaire lors d'une infection pulmonaire létale à Pa dans un modèle murin. Cette étude est la preuve de concept pour le développement d'un nouveau vaccin anti-Pa capable d'engendrer une plus grande immunité que les vaccins recombinants et vivants atténués testés jusqu'alors. Nous avons par ailleurs la capacité de modifier la souche vaccinale afin qu'elle exprime fortement certains effecteurs bénéfiques en vue d'une meilleure réponse immune, tels que les protéines du SST3 (PopB, PcrV) ou les porines OprF et OprI.



ARTICLE ORIGINAL

Killed but metabolically active *Pseudomonas aeruginosa* based-vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections

Elodie Meynet[1], David Laurin[2,4], Jean Luc Lenormand[2], Boubou Camara[1], Bertrand Toussaint[2,3], Audrey Le Gouëllec[2,3,*]

[1] Department of Pneumology, CHU Grenoble Alpes, France

[2] Univ. Grenoble Alpes, Timc-Imag CNRS UMR 5525. F-38000 Grenoble, France.

[3] Institut de Biologie, Dept de Biochimie, CHU-Grenoble Alpes, France

[4] Etablissement Français du Sang, BP35, 38701 La Tronche, France

*Author to whom correspondance should be addressed : Faculté de Médecine et Pharmacie, Domaine de la Merci, 38700 LA TRONCHE, France;

E-mail: ALegouellec@chu-grenoble.fr

Abstract

Pseudomonas aeruginosa (Pa) is responsible for an important morbidity and mortality especially in cystic fibrosis patients. Its eradication is difficult because of a huge phenotypic adaptability and the development of antibiotic resistances. After the failure of several recombinant vaccines which solicit only humoral response, live-attenuated vaccines pay attention thanks to their ability to elicit a broad immunity with both humoral- and cell-mediated responses, indispensable to fight against this pathogen. In this study, we developed an innovative and safer live-attenuated Pa vaccine based on killed but metabolically active (KBMA) attenuation method. This KBMA Pa presented here, has been further rationally designed to overexpress beneficial effectors exemplified here by overexpression of the type 3 secretion system apparatus. We demonstrate that KBMA Pa elicit a high and broad humoral response in mice against several antigens of particular interest such as OprF and PcrV proteins. Moreover, we assess cytokines in the serum of immunized mice and we show that KBMA Pa elicit Th1, Th2 and especially Th17 pathways of cell-mediated immune response. Th17 pathway involvement is also confirmed after specific stimulation of helper T cells in immunized mice. Finally, we show that this vaccine is safe and has a protective efficacy in a murine acute pulmonary infectious challenge. In conclusion, KBMA Pa is a new platform with high potential for the development of a vaccine against Pa.

Keywords

Vaccine, Killed but metabolically active, infectious disease, Cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa,* Th17*.*

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF) patients have disturbed primary lung defenses and rapidly suffer from pulmonary infections with different bacteria. *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) is by far the most significant pathogen in CF adults and seems to lead to pulmonary infections [1, 2]. The acquisition of this microorganism is associated with poor clinical outcome [3-6]. Curative treatments such as antibiotics are not sufficient to eradicate *P. aeruginosa* because it displays intrinsic multidrug resistance and has a tremendous capacity to acquire further resistance mechanisms [7, 8]. Moreover, during chronic infections it can sometimes adopt a mucoid phenotype and is also thought to adopt a biofilm-like mode of growth, resulting in protection from host immune system and antibiotic attack [9]. Thereby, the best way to limit morbidity of Pa in CF would be to develop a vaccination strategy that would limit chronic colonization of CF lungs by Pa, reduce acute exacerbation frequency and maintain an optimal composition of pulmonary microbiota.

But after 40 years of research and clinical trials up to phase 3, no biotechnology company has met the challenge of achieving a safe, immunogenic and effective vaccine against Pa. It has been broadly discussed that only a vaccine which would cause both humoral- and cell-mediated immune responses would be protective and could help to neutralize or eliminate Pa [10-16]. Subcellular recombinant vaccines have already been tested targeting different candidate antigens (lipopolysaccharide, alginate, flagellum, type 3 secretion system (T3SS) with PopB and PcrV, or porins OprF and OprI). However despite numerous clinical trials, these vaccines failed to be protective for CF patients mainly because of the phenotypic plasticity of Pa but also because clinical trials were not properly designed [17]. Thereby, live-attenuated vaccines began to be developed to closely mimic the huge antigenic variability of Pa,

and appeared to be particularly interesting by the strong and broad range of immune responses they can elicit including localized mucosal as well as systemic humoral- and/or cell-mediated immunity as for Pertussis vaccine development [18-21]. Th17 pathway has been proven to be essential to obtain the eradication of Pa [22] and some proteins of Pa have been identified as being able of causing a high secretion of IL-17 such as PopB, FpvA, FptA, OprL and PilQ [21]. Therefore, the purified PopB protein which belongs to the translocon of the T3SS generates a strong Th17 response which contributes to the increasing clearance of Pa in lung and spleen after challenge. Thus a new vaccine candidate that would lead to humoral production against LPS and other antigens, ideally from all the bacterium, for antibody opsonization and at the same time that would stimulates cellular immune effectors, among which Th17, would be of major interest. But nowadays live-attenuated bacteria retain sufficient virulence to make them unacceptable for human vaccines.

Therefore, our recent efforts were concentrated to develop safer strategies of use of these attenuated forms of virulent pathogens. Killed But Metabolically Active bacteria (KBMA) as vaccine vector have been considered first by Brockstedt *et al.* in 2005 using *Listeria monocytogenes* [23]. Briefly, the deletion of two *uvr* genes (A and B) coding for Exonucleotidase A and B subunits, which are involved in DNA repair systems, renders bacteria sensitive to psoralen-induced DNA crosslinking [24]. Consequently, the *ΔuvrAB* nucleotide excision repair mutant cannot replicate after photochemical treatment (PCT) because of the presence of infrequent and randomly distributed crosslinks of DNA [25] (Fig. S1). However, bacterial genes can still be expressed, a fact that allows KBMA bacteria to retain the essential properties of live bacteria without the ability to proliferate. This innovative vaccine approach based on *L. monocytogenes* strain has been demonstrated to elicit T-cell responses, to protect

mice against virus challenge in an infectious disease model and to provide therapeutic benefit in a mouse cancer model [26]. Other studies described the use of the KBMA concept as vaccines derived from attenuated forms of virulent pathogens, such as for visceral leishmaniasis and for *Bacillus anthracis* [27, 28]. Thus, this technology could be applied to *P. aeruginosa* strain and envisioned as "a new vaccine paradigm" in which the safety of a killed vaccine and the potency of a live vaccine are combined. A Δ*uvrAB* deletion mutant (named OSTAB) in which all of the major secreted exotoxins of Pa are naturally absent (ExoU) or suppressed by gene deletion (ΔexoS, ΔexoT) was previously developed and we showed that KBMA Pa has the potential to deliver heterologous antigens to human antigen-presenting cells (APCs) *in vitro* via T3SS with considerable attenuated cytotoxicity toward APCs as compared with the wild-type vector [29]. Furthermore, KBMA Pa anti-tumor vaccine conserved its capacity to induce a tumor associated antigen-specific cytotoxic cellular immune response [29, 30] and a long-term memory response [31]. In this study, we report the construction of engineered KBMA Pa vaccine with pEi plasmid to force the expression of T3SS at the surface of Pa in order to induce immunization and protection against the virulent Pa. We demonstrated that KBMA Pa +IPTG vaccine is safe and provides protective humoral- and cell-mediated immunity against lethal Pa challenge in mice. This study is a proof of concept for the development of the new Pa vaccine that elicits a greater breadth of immunity than existing subunit vaccines.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and media

The bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table S1. The photochemical sensitive strain OSTAB mutant was previously generated from the Pa

strain CHA-OST [32] by deleting *uvrA* and *uvrB* genes by Cre/lox-based mutagenesis [33]. The strain is transformed with pEi plasmid (GenBank accession number JQ733380). Media used for bacterial cultures were Lysogeny broth (LB, Miller) and Pseudomonas isolation agar (PIA, Difco™, BD). Whenever it is cited, carbenicillin (Cb) concentration was used at 300µg/mL, IPTG at 0.5mM.

2.2. Preparation of bacterial strain for immunization

Frozen bacterial stocks of OSTAB pEi strain were grown overnight in LB containing Cb, at 37°C, 300 rpm. After washing the overnight culture twice with 1mL LB, bacteria were resuspended in culture at an optical density at 600nm (OD600) of 0.2 in LB containing either Cb (condition KBMA Pa) or Cb+IPTG (condition KBMA Pa+IPTG) until the OD600 reached a value of 0.5. Inactivation of bacteria was then obtained using the photochemical treatment: after the addition of 10µM of amotosalen (a gift from EFS Grenoble, France) in the culture medium and when the OD600 reached a value of 1, bacteria are subjected to illumination with UVA 365nm (7,2J/cm²) during 40 minutes, as previously described [29]. Concentrations were adjusted spectrophotometrically and confirmed retrospectively by colony-forming units (CFU) counting on PIA at 37°C.

2.3. Immunization of mice

We used female C57Bl/6J mice as they are known to be susceptible to chronic bronchopulmonary Pa infections and able to produce high antibody levels [34, 35]. Mice were purchased at an age of 6-8 weeks from Janvier SA (Le Genest-Saint-Isle, France) and were kept under specific pathogen-free conditions in the PHTA animal facility at the University of Grenoble Alpes (France). All animal experiments were

performed in accordance with institutional and national guidelines. All efforts were made to minimize suffering to the animals. All mice were anesthetized (isoflurane) and inoculated three times at 2 weeks' interval by injecting 100 µl of the vaccine preparation subcutaneously (s.c) with Insulin syringe Ultra-Fine™ Needle 8 mm x 31 G (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) in the right flank. Escalating doses of 1 x 10^8 CFU/mouse, 2 x 10^8 CFU/mouse and 2 x 10^8 CFU/mouse were administered at 14 day intervals.

2.4. Evaluation of the humoral response

Anti-PcrV and anti-OprF specific antibodies were assessed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using Nunc MaxiSorp® flat bottomed 96-well plates (Dutscher, France) coated overnight at 4°C with 5µg/mL of recombinant proteins as antigens in 0.01M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. For that, we have produced and purified the recombinant PcrV protein (from the clone BL21(DE3) pET15b-PcrV [36] a gift from Grenoble CEA, France), and the OprF porin in a proteoliposome [37]. The plates were blocked with 2% BSA for 1 hour. Serial sera dilutions were added to each well and incubated for 1 hour. Following three washes with PBS containing 0.5% Tween 20, a peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) diluted 1: 1,000 in PBS was added and incubated for 1 hour. Then, 100µL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution was added to each well, incubated for about 15 minutes in darkness, and then an equal volume of stopping solution (1N H_2SO_4) was added. Optical density at 450nm was measured with a microplate reader (TriStar Berthold Technologies). For the interpretation of the results, a positive threshold corresponding to the upper limit of the negative controls

was fixed (sum of the average of the negative controls plus three times the standard deviation).

2.5. Evaluation of the cell-mediated immune response

Multiplex bead-based immunoassay: determination of immune mediators

Retro-orbital blood sampling (200 µl) from PBS-, KBMA Pa+IPTG-immunized mice (n=5) were collected in eppendorf tubes at 1, 7 and 21 days post immunization (p.i.) and after clotting were centrifuged at 1,500g for 10 minutes at 4 °C. Serum samples were stored at −20 °C. Samples were frozen and thawed only once. A mouse cytokine 23-Bio-Plex assay kit was used to perform measurements (Bio-Rad). IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, Kc, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, and TNF-α were measured using Luminex xMAP technology according to the manufacturer's instructions (BioRad Laboratories, Hercules, CA) and as previously described [29]. Plate was read on Bio-Plex MAGPIX™ Multiplex Reader and analyzed with the software Luminex Xponent and Graph Pad Prism.

Cytokine production by KBMA Pa vaccine-elicited specific-T cells

At day 5 p.i. spleens of mice were recovered and dissociated into single-cell suspensions by mechanical dissociation in C Tubes on gentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec). Splenocytes were harvested for *ex vivo* restimulation by syngenic $DC_{2.4}$ cell line (a kind gift from APcure SA, Grenoble) which is professional antigen-presenting cells (APCs). Prior to co-cultivation, $DC_{2.4}$ APCs were exposed to KBMA Pa during 1 hour to capture antigens. Then the APCs were washed and cultured overnight for antigen processing in RPMI 1640 medium supplemented with antibiotics

(20 µg/mL ciprofloxacin and 50 µg/mL gentamicin) and 10 % fetal bovine serum (FBS). The activated APCs were counted and used to stimulate 2 x 10^6 spleen cells at a ratio of 1 $DC_{2.4}$ to 10 spleen cells. APCs not exposed to the bacteria were used as control to measure the background responses by helper T cells. The spleen cells and APCs were cocultured for 6 hours in the presence of 1 µg/mL brefeldin A protein transport inhibitor (BioLegend). Next, the cells were labeled with the Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit (Invitrogen) and surface-labeled by anti-CD4 (RM4-5, BioLegend) and anti-CD3 (145-2C11, BD Biosciences) specific antibodies. Next the cells were washed, fixed and permeabilized for intracellular labeling with CytoFix/CytoPerm buffer (BD Bioscience) and washed in PermWash solution according to manufacturer's preceding. Fixed/permeabilized cells were resuspended in PermWash buffer for intracellular staining with specific anti-mouse IFN-γ (XMG1.2), IL-17 (T TC11-18H10.1) and TNF-α antibodies (MP6-XT22) (all from BioLegend). Unspecific stimulation with 20 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + 1 µg/mL ionomycin (iono) were used to measure the total helper T cells producing IL-17 defining the Th17 subtype and IFN-γ but not the IL-17 defining the Th1 subtype and the TNF-α production. Samples were acquired on a FACSCanto II (BD Biosciences) and analyzed using Diva dedicated software.

2.6. Body weight measurement of mice

To evaluate the toxicity of KBMA Pa *in vivo*, immunized and unimmunized mice were weighed weekly for 8 weeks. The behavior of mice was observed every 2 days and weight measured every 7 days.

2.7. Acute Pa lung infection challenge

Frozen bacterial stocks of CHA strain (Table S1) were grown overnight in LB medium at 37°C, 300 rpm. After washing the overnight culture with 1 mL LB, bacteria were inoculated in LB at an OD600 of 0.2 and grown until an OD600 of 1.5-1.8 at 37°C, 300 rpm. Bacteria were resuspended in PBS. Concentrations were adjusted spectrophotometrically and confirmed after overnight growth on PIA at 37°C. Acute pulmonary infection challenge was performed on mice by placing 20µL of this bacterial suspension on each nostril (40µl/mouse; 5 x 10^6 CFU/mouse) three weeks after the last immunization boost. Animal health was recorded and mice were euthanized if necessary according to different clinical signs based on the mouse grimace scale recently published [38].

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis on mice data were generated by the Graph Pad Prism 7 for Windows (Graph Pad Software, La Jolla California USA). Tests undertaken were t test non-parametric unpaired analysis (Mann-Whitney) and Log-rank test.

3. Results and Discussion

3.1. Vaccination with KBMA Pa induces broad humoral responses in mice

To further evaluate vaccine potential of the KBMA Pa, we vaccinated mice s.c 3 times every 14 day intervals and sera were harvested 3 weeks p.i. All immunizations in 6-8 weeks' year's old mice were done without adjuvants. We used KBMA Pa transformed with the pEi plasmid containing an episomal copy of the gene *exsA*, coding for the major activator of T3SS [39], under the control of an isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible promoter (ptaq) [29] (Fig. S2). When cultivated in presence of IPTG, this plasmid warrants the controlled formation of a

pre-assembled T3SS needle and hence of all the proteins of T3SS apparatus comprising PcrV, before bacterial injection into the host. In immunized mice, KBMA Pa+IPTG elicited a significant anti-PcrV antibody titer (1/16,000) ($p=0.0011$) compared to PBS control (Fig. 1A), while KBMA Pa did not ($p=0.9591$). KBMA Pa and KBMA Pa+IPTG elicited both a significant anti-OprF antibody titer (1/4000) ($p=0.0015$ and $p<0.0001$ respectively) compared to PBS control (Fig. 1B). Thus, the addition of IPTG during the preparation of the vaccine allows an efficient immunization which results in a yield of anti-PcrV and anti-OprF specific antibodies significantly higher. And it has already been shown that high anti-PcrV titers can help to protect against virulent Pa infections [40-42]. OprF, is also a major virulence factor of Pa and above all is antigenically related among all serotypes [43, 44]. As we used whole Pa bacteria as vaccine vector, it allows the presentation of the entire antigenic repertory to host immunity, supposed to be close to what occurs during Pa infections. In conclusion, we showed here that KBMA Pa +IPTG vaccine elicits a humoral immune response against several relevant antigens of Pa.

3.2. Vaccination with KBMA Pa induces cell-mediated immune responses in mice but after 21 days p.i inflammation is resolved

Based on results presented above, KBMA Pa +IPTG induced humoral- mediated immune response. Therefore, this vaccine was further assessed for the cellular-mediated immune response. Following the same scheme of vaccination as before, mice (n=5) were immunized and sera were collected at days 1, 7 and 21 post immunization (p.i) with KBMA Pa+IPTG vaccine. The balance between Th1 (IFN-g, TNF-a, IL-12), Th2 (IL-4, IL-5 and IL-10) and Th17 (IL-17) cytokine responses to immunization and hematopoiesis-related chemokines (GM-CSF, G-CSF, MCP-1, …)

were assessed by xMAP technology. Among the 23 cytokines and chemokines analyzed, high levels of IL-12p70, IL-6, IL-17, GM-CSF, G-CSF, IL-5, IL-10, IL-13, TNFα, MIP-1b and MCP-1 were observed at days 1 and 7 ($p<0.0005$) (Fig. 2).

One day p.i., levels of G-CSF and MIP-1b were very significant ($p<0.0001$). Levels of IL-17 ($p<0.0001$), TNFα ($p<0.0001$), KC ($p<0.0001$), IL-13 ($p<0.0001$), MCP-1 ($p<0.0001$) and levels of IL-12p70 ($p<0.0005$), IL-6 ($p<0.0005$), GM-CSF ($p<0.0005$) and IL-10 ($p<0.0005$) were significantly higher in KBMA Pa+IPTG immunized mice than in unimmunized mice.

Interestingly, at day 7 p.i. levels of IL-17 were highly detected ($p<0.0001$) as well as levels of TNFα and MIP-1b ($p<0.0001$ for both). We also detected the presence of IL-12p70 ($p<0.0001$), G-CSF ($p<0.0001$), INFɣ ($p<0.0001$), IL-13 ($p<0.0001$), IL-1α ($p<0.0005$) and MCP-1 ($p<0.0001$) and increased levels of IL-6 ($p<0.0005$), GM-CSF ($p<0.0005$), IL-5 ($p<0.0005$), IL-10 ($p<0.0005$), and MIP-1a ($p<0.0005$) in immunized mice.

At day 21 p.i., all cytokine and chemokine levels in immunized mice went back to the normal, attesting the end of the immune response.

Therefore, we demonstrated here that KBMA Pa vaccine elicited several important and determinant pathways of cellular response, such as Th17 (IL-17), Th1 (INF-ɣ) and Th2 (IL-5, IL-10, IL-13). Moreover, we detected the active IL-12 (IL-12p70), a cytokine produced by APCs that is essential for the differentiation, proliferation, and maintenance of Th1 responses and involved in cytotoxicity mediated by NK cells and T cells. These immunity pathways, and particularly Th17 pathway, have been shown to be essential to eradicate Pa [22]. Furthermore IL-17 has also been shown to play a protective role during acute pulmonary Pa infection in mice [45]. Since we observed that KBMA Pa vaccine allows an early high rates production of IL-17 at days 1 that is

maintain up to day 7, the protective efficacy of the immune response can be expected.

Moreover, the rational design of the KBMA Pa vaccine presented here allows the overexpression of beneficial effectors inducing the Th17 pathway such as PopB protein by the induction of the T3SS thanks to the IPTG inducible plasmid. We argue that it could increase this essential Th17 immune response and could benefits to the eradication of the pathogen. Indeed, it has been shown that PopB-immunized mice were protected from lethal pneumonia in an antibody-independent but IL-17-dependent manner and PopB was shown to elicit an important Th17 response and to enhance the clearance of Pa from lung and spleen after challenge [21]. Thus, including PopB controlled overexpression to KBMA Pa vaccine seems a very promising way to improve the effectiveness of the vaccine candidate.

To determine specific cell-mediated immune response generated by the KBMA Pa+IPTG vaccine, splenocytes were harvested from mice (n=6) at day 5 p.i and the frequencies of single helper T-cells, defined as $CD3^{+}CD4^{+}$, were evaluated by flow cytometry using cytokine intracellular staining assay (Fig. 3). We observed a significant increase in the frequency of Th1 ($p<0.05$) and Th17 ($p<0.0005$) helper T-cells in KBMA Pa immunized mice compared to unimmunized mice, but no significant increase for TNF α producing helper T-cells (Fig. 3D). As expected, APCs which are not exposed to the bacteria were unable to stimulate helper T-cells from unimmunized mice attesting the absence of helper T-cells specific of Pa antigens in absence of vaccination (Fig. 3E). On the contrary, splenocytes from immunized mice stimulated by APCs presenting KBMA Pa antigens showed significant high frequencies of Th17 and TNF-α helper T-cells compared to splenocytes from unimmunized mice ($p<0.005$ and $p<0.0005$ respectively). The spleen T-cells from

immunized mice stimulated by APCs unexposed to the bacteria did not induce cytokine production, attesting of an absence of unspecific stimulation (Fig. 3E). We thus observed a helper T-cell stimulation only from mice immunized and stimulated by Pa. To summarize, these data confirm that KBMA Pa vaccine elicits a specific helper T-cell immune response with multiple pathways comprising Th17 and Th1 subtypes and TNF-α producing helper T-cells. Taken together, the presence of cytokines and chemokines associated with specific stimulation of helper T cells in immunized mice, especially the presence of IL-17, as well as Th17 T-cells are very encouraging for the use of KBMA Pa vaccine as an effective vaccine to protect against the infectious native bacteria.

3.3. Tolerance of KBMA Pa vaccine in mice

In vitro cytotoxicity of KBMA Pa was already tested on human monocyte-derived DCs [29] and KBMA Pa was shown to be less cytotoxic than a lived strain, killing only 17% of cells at its highest multiplicity of infection (100:1). Before evaluating the vaccination in mice, we examined the toxicity of our KBMA Pa vaccine. There was no significant difference (Fig. 4) in term of weight gain between KBMA Pa+IPTG immunized mice and unimmunized mice ($p=0.4418$), although there is a slowdown in weight gain from day 21 which could correspond to the establishment of immunity. Thus, this general toxicity test in mice revealed normal weight gains following 3 injections of KBMA Pa vaccine. Moreover, throughout the 8-week period all animals were found to be healthy with no changes in their fur, eyes and behavioral patterns. We already know that KBMA Pa vaccine vector is less cytotoxic than a lived strain [29], and based on these data and observations, we showed that KBMA Pa vaccine does not affect the behavior of mice and seems to be well tolerated.

3.4. Efficacy of KBMA Pa vaccine in a lethal acute lung infection challenge

To further evaluate the vaccine efficacy of the KBMA+IPTG Pa preparation, the immunized mice (n=12) were challenged via the intranasal route with the wild type CHA strain at the dose of 5 x 10^6 CFU on day 21 p.i. to evaluate protection. As shown in Fig 5, all unimmunized mice died from lethal infection. On the contrary, 58,3% survival was noted in mice immunized. The first death in immunized mice occurred at the 48th hour after the infectious challenge and at the 150th hour, 7/12 immunized mice (58,3%) were still alive and in good health. Therefore, we demonstrated that KBMA Pa vaccine allows a protective efficacy in mice, with significant difference compared to unimmunized mice ($p<0.0001$) in the lethal challenge.

Conclusions

We demonstrated here that KBMA Pa vaccine is immunogenic as it elicits a broad immune response. Firstly, humoral response is strong with high antibody titer for two proteins, OprF and PcrV with addition of IPTG. Secondly, cell-mediated immune response is broad with the activation of several pathways such as Th1, Th2 and notably Th17 pathway known to be necessary to eradicate Pa. KBMA Pa vaccine elicits a specific helper T-cell response with multiple pathways involving Th17 and Th1 subtypes and TNF-α producing helper T-cells. We showed that this live-attenuated vaccine, which cannot replicate in its host, is very promising in term of safety of use and has a protective efficacy in mice during an acute pulmonary infectious challenge. In conclusion, KBMA Pa is a major advance for the vaccination against Pa as demonstrated here in a preclinical murine model.

Conflicts of interest

A. Le Gouëllec and B. Toussaint declare competing financial interest. They are the cofounders of APcure, a start-up that produces immunotherapy treatments for patients with cancer.

Acknowledgments

The authors thank Ina Attree and Michel Ragno at CEA (Grenoble, France) for the gift of the clone BL21 (DE3) pET15b-PcrV. They thank Habib Mohammed, Atanur Ersayin, and Yan Wang.

The work was done in Grenoble, France. E. Meynet was supported by a grant (Année Recherche 2015-2016) from the Faculty of Medicine, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France). The authors thank « Vaincre La Mucoviscidose » for their contribution to the funding of this work and their continuous support.

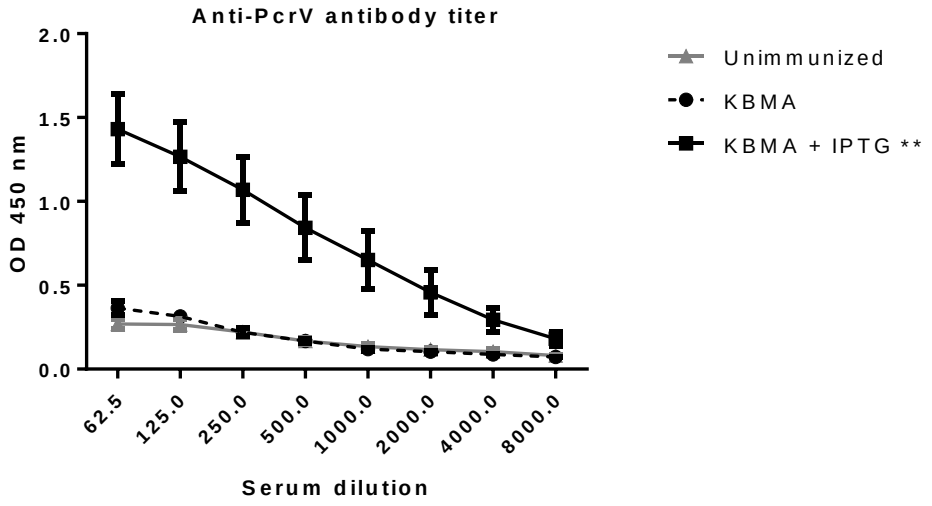
Author contributions

E. Meynet, D. Laurin and A. Le Gouëllec realized experiments. E. Meynet wrote the manuscript draft; A. Le Gouëllec, D. Laurin, J.L Lenormand and B. Toussaint provided conceptual advice and input to the manuscript; E. Meynet, A. Le Gouëllec, D. Laurin and B. Toussaint reviewed and revised the paper.

Figures

Fig. 1. Polyvalent humoral response elicited by KBMA Pa vaccine. ELISAs were performed on sera of immunized with either KBMA Pa (n=6) or KBMA Pa+IPTG (n=18) and unimmunized mice (n=18) collected 3 weeks after the last immunization. **A)** PcrV and **B)** OprF as coated antigens. Non-parametric unpaired Mann-Whitney t tests were used for statistical analysis. Error bars are SEM. Positive threshold of 0.26 for PcrV and 0.51 for OprF. **p<0.005, ****p<0.0001. *OD: optical density.*

A



B

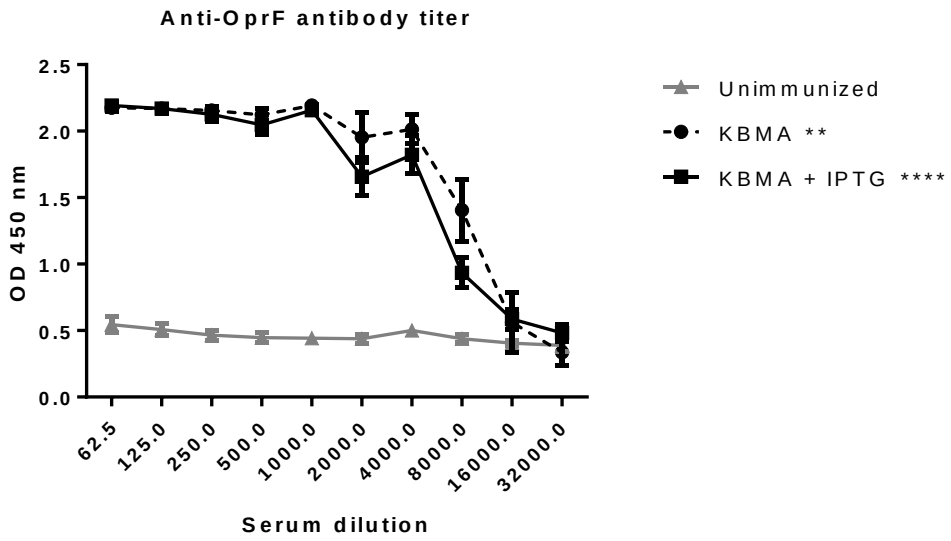


Fig. 2. Dynamic of cytokine serum profile after last immunization with vaccine KBMA. A multiplex immunoassay was performed in duplicate to determine the expression levels of 23 different cytokines in sera samples of immunized (n=5 per group) and unimmunized mice (n=15: pool of all unimmunized mice) collected at days 1, 7 and 21 after the last immunization. Only the cytokines that were significantly different from the control (*$p < 0.05$) are shown in mice immunized with KBMA + IPTG. Non-parametric unpaired Mann-Whitney t tests were used for statistical analysis. Scatter plots represent averages and bars mean with SD. *$p<0.05$, **$p<0.005$, ***$p<0.0005$, ****$p<0.0001$. D1: day 1; D7: day 7; D21: day 21 after the last immunization.

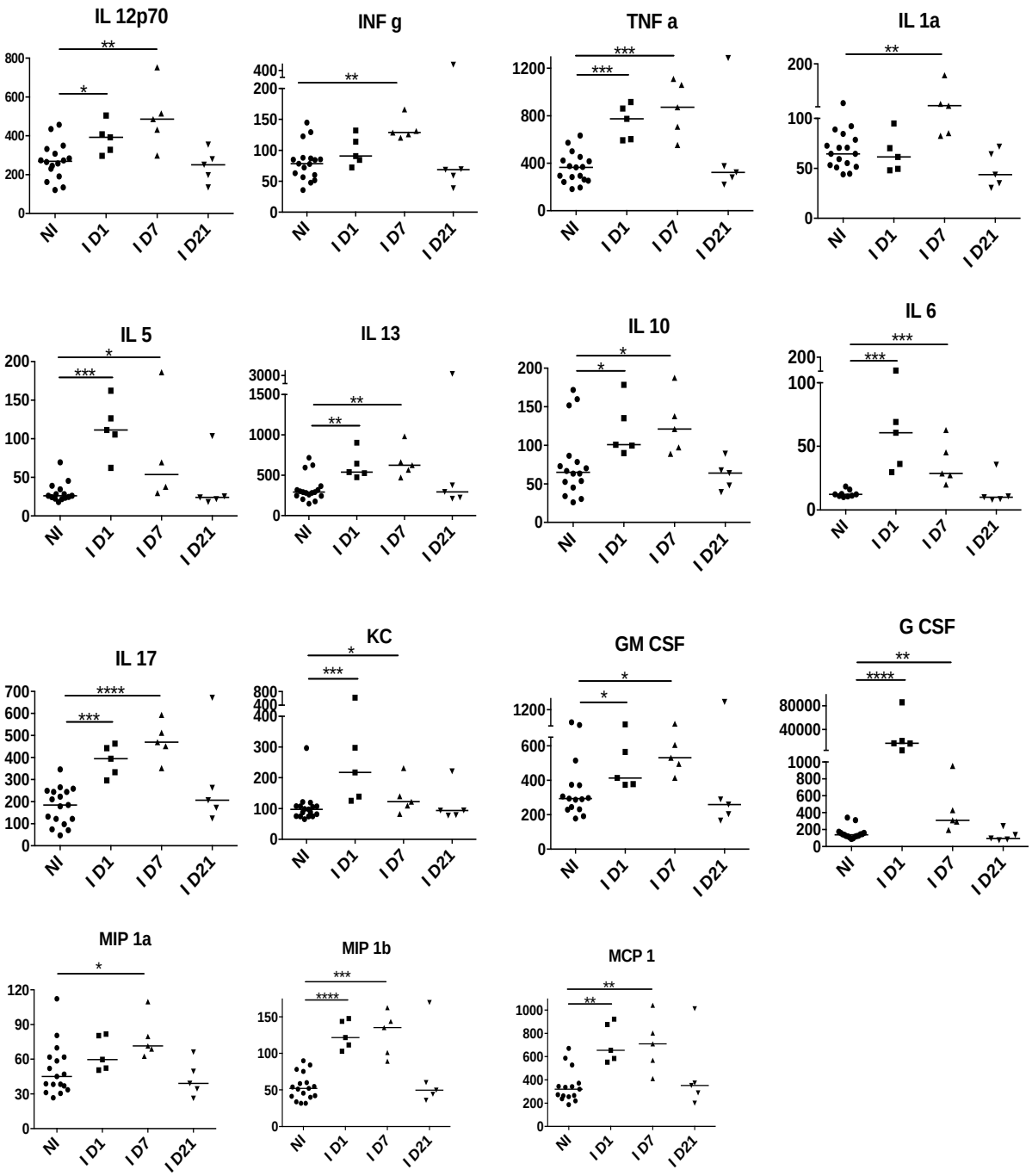

IL 12p70
INF g
TNF a
IL 1a
IL 5
IL 13
IL 10
IL 6
IL 17
KC
GM CSF
G CSF
MIP 1a
MIP 1b
MCP 1
NI
I D1
I D7
I D21

Fig. 3. Specific cellular response elicited by KBMA Pa vaccine. **A)** Flow cytometry successive gating strategy for detection of helper T cells from the spleen. The singlets cells without damaged membranes and thus not permeable to the reactive dye were considered as viable cells and gated on $CD3^{+}CD4^{+}$. **B)** Flow cytometry threshold strategy for detection of helper T cells effector activity by cytokine intracellular staining assay. Isotypes control antibodies were used to set-up the background. **C and D)** Unspecific stimulations with PMA/ionomycin were used to analyze the frequency of helper T cells producing IL-17 defining the Th17 subtype and IFN-γ but not the IL-17 defining the Th1. We also analyzed the TNF-α production by the helper T cells. **C)** Shows a single example of helper T cells cytokine production by spleen cells from not immunized mice and immunized mice. **D)** Summarize the data. **E)** Syngeneic $DC_{2.4}$ APCs presenting KBMA Pa antigens (KBMA) after overnight processing were used to stimulate spleen and measure the helper T cells specific responses to KBMA Pa vaccine. APCs not exposed to the bacteria (DC Ø) were used as negative stimulating condition for background evaluation. **D and E)** Mean and SEM frequency of Th17, Th1 and TNF-α helper T-cells is depicted for not immunized mice and immunized mice. Unpaired t test differences between the two groups are indicated (*$p<0.05$, **$p<0.005$, ***$p<0.0005$).

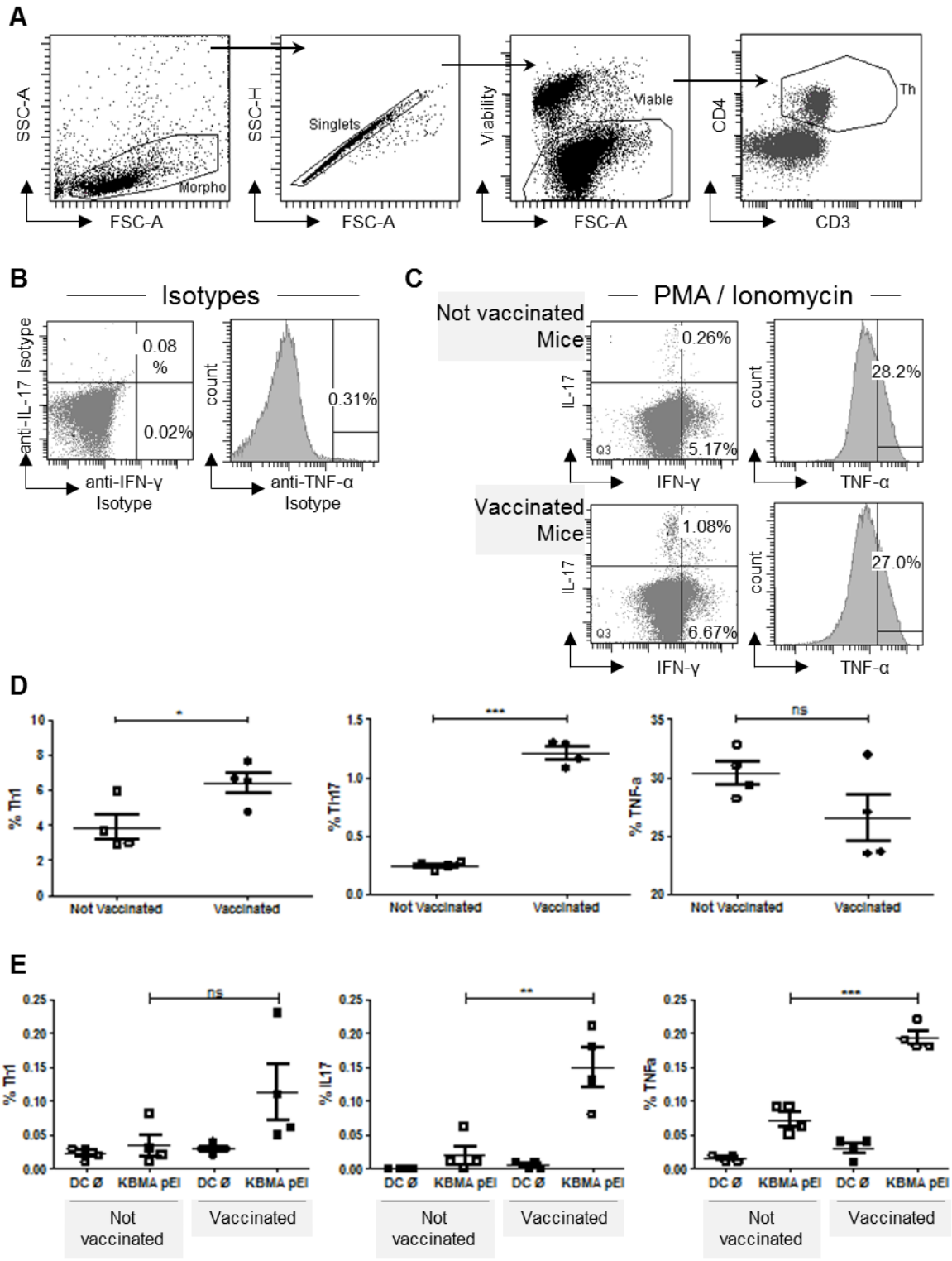

A
SSC-A
FSC-A
Morpho
SSC-H
Singlets
Viability
Viable
CD4
CD3
Th
B
Isotypes
anti-IL-17 Isotype
0.08 %
0.02%
anti-IFN-γ Isotype
count
0.31%
anti-TNF-α Isotype
C
PMA / Ionomycin
Not vaccinated Mice
0.26%
5.17%
IL-17
IFN-γ
Q3
count
28.2%
TNF-α
Vaccinated Mice
1.08%
6.67%
27.0%
D
% Th1
% Th17
% TNF-a
Not Vaccinated
Vaccinated
ns
E
% Th1
% IL17
% TNFa
DC Ø
KBMA pEI
Not vaccinated
Vaccinated

Fig. 4. Body weight of KBMA Pa unimmunized and immunized mice. Immunized (n=35) and unimmunized mice (n=30) were weighted weekly for 8 weeks. Non-parametric unpaired Mann-Whitney t test was used for statistical analysis. Error bars are mean with SD, p=0.4418.

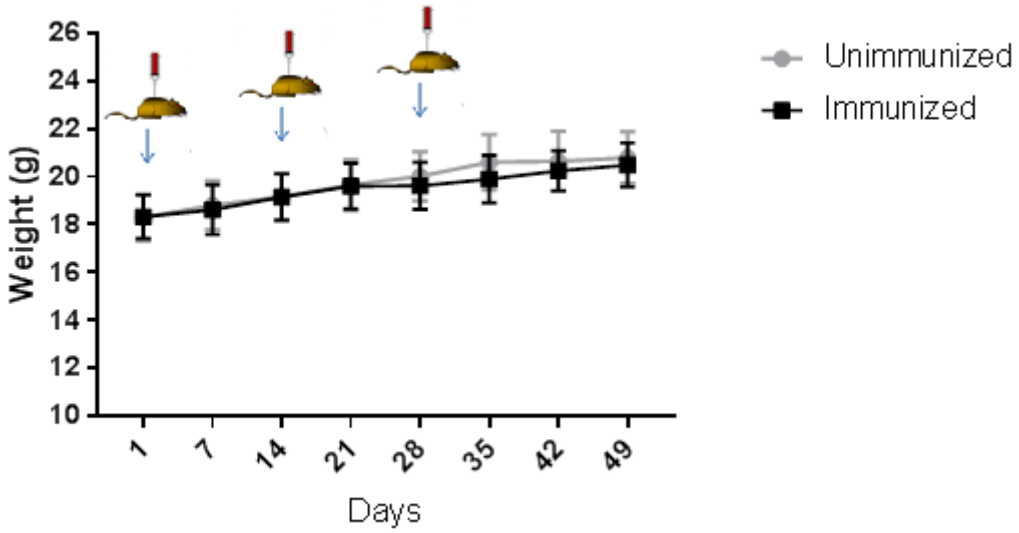
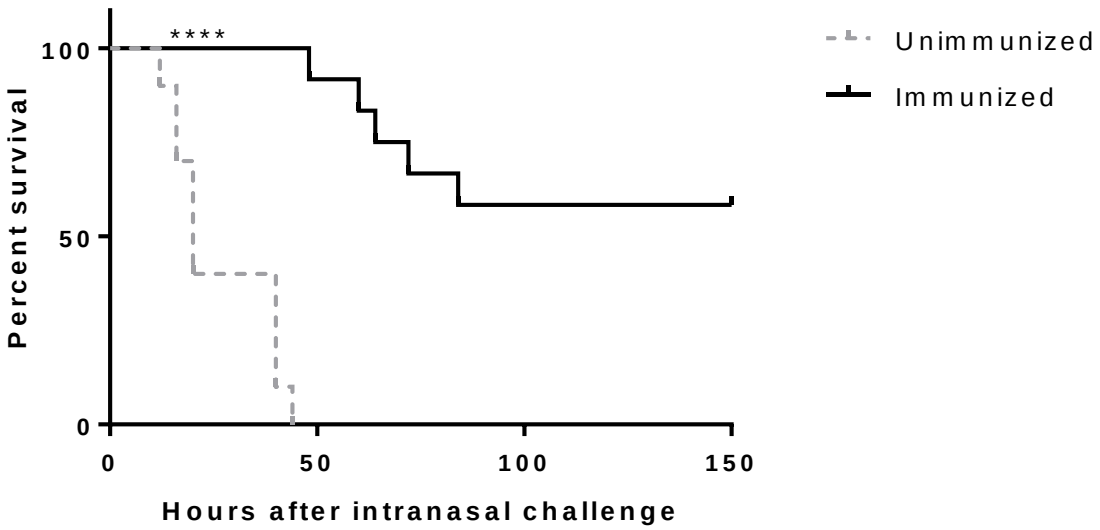


Fig. 5. Protective efficacy conferred by KBMA Pa vaccine. Intranasal infectious challenge with 5 x 10^6 CFU/mouse of CHA strain were performed on KBMA Pa+IPTG immunized mice (n=12) and unimmunized mice (n=10), 3 weeks after the last immunization. Animals were then observed for survival every four hours for up to one week, animal health was recorded and mice were euthanized if necessary according to different clinical signs. Log-rank test was used for statistical analysis. ****p<0.0001.



Supplementary data

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Name	Relevant characteristics
Bacterial strains	
CHA	*Wild type, P. aeruginosa mucoid strain, CF isolate from CHU Grenoble*
OST	*CHA strain deleted for Exotoxins S and T (ΔexoS, ΔexoT)*
OSTAB2	*CHA-OST strain deleted for uvrA and uvrB genes (ΔuvrA::lox ΔuvrB::lox), susceptible to photochemical treatment*
OSTAB2 pEiS54	*CHA-OSTAB2 transformed with empty plasmid pEAi-S54 (inducible exsA gene; secretion tag)*
Plasmids	
pEiS54	
pET15b-pcrV	*Empty plasmid with inducible exsA gene and secretion tag* *Gift from Ina Atree (CEA, Grenoble, France)*

Fig. S1. Killed but metabolically active *Pseudomonas aeruginosa* attenuation method. Amotosalen molecule added during the bacterial growth targets nucleic acid **(1)** allowing a crosslink at this level **(2)**. Ultraviolet A (UVA) illuminations generate permanent crosslinks **(3)** and thereby prevent DNA replication, making bacteria unable to proliferate **(4)**.

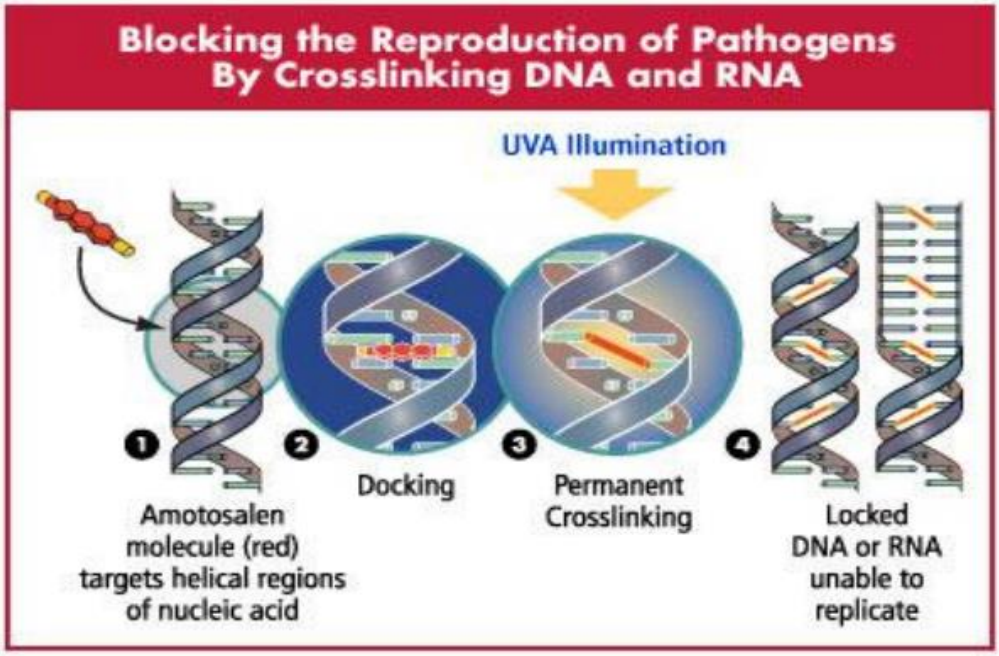
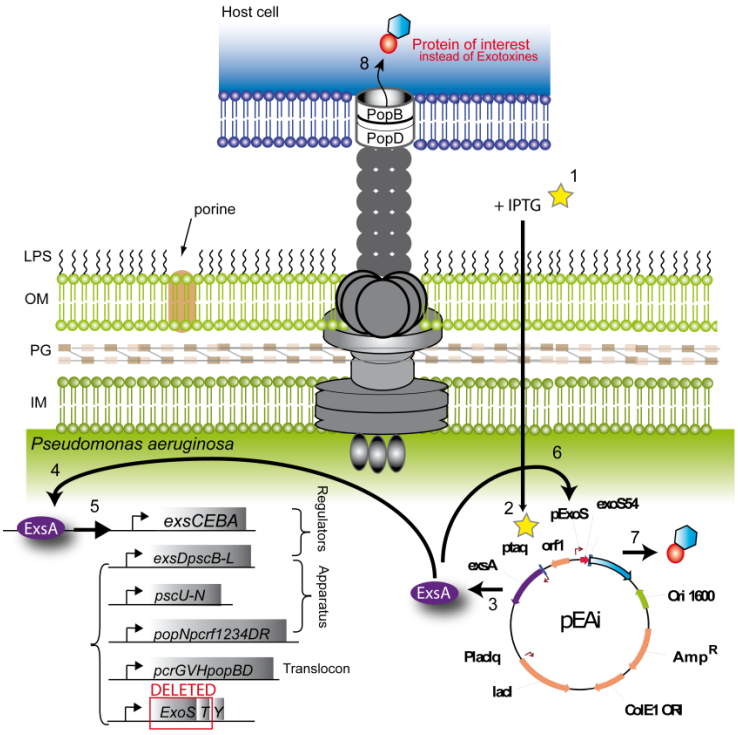


Fig. S2. Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. The T3SS is similar to a “micro syringe” passing through both bacterial membranes and able to penetrate in the membrane of the targeted eukaryotic cell in order to inject toxins directly into cytoplasm. KBMA attenuation strategy was applied on *P. aeruginosa* OSTAB2 pEiS54 strain to develop a micro syringe for antigen delivery based on the T3SS of this bacterium. In this *P. aeruginosa* strain, all of the major secreted exotoxins are absent (ExoU) or deleted (*ΔexoS, ΔexoT*). This strain has also been deleted for *uvrA* and *uvrB* genes (*ΔuvrA, ΔuvrB*), involved in DNA repair, in order to make it susceptible to photochemical treatment. This strain has been transformed with a plasmid (pEiS54) containing an episomal copy of the *ExsA*, the major activator of T3SS, under the control of an isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible promoter (ptaq).

OM: outside membrane; IM: inside membrane; PG: proteoglycan; LPS: lipopolysaccharide.



References

[1] Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, et al. Longitudinal assessment of Pseudomonas aeruginosa in young children with cystic fibrosis. J Infect Dis. 2001;183:444-52.

[2] Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168:918-51.

[3] Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M, Alhede M. Pseudomonas aeruginosa biofilms: mechanisms of immune evasion. Adv Appl Microbiol. 2014;86:1-40.

[4] Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, et al. Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol. 2012;10:841-51.

[5] Winstanley C, Fothergill JL. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis Pseudomonas aeruginosa infections. FEMS Microbiol Lett. 2009;290:1-9.

[6] Cigana C, Lore NI, Bernardini ML, Bragonzi A. Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in Pseudomonas aeruginosa Pneumonia. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:852513.

[7] Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. Trends Microbiol. 2011;19:419-26.

[8] Strateva T, Yordanov D. Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol. 2009;58:1133-48.

[9] Hoiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. Future Microbiol. 2010;5:1663-74.

[10] Johansen HK, Gotzsche PC. Vaccines for preventing infection with Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 2015;8:CD001399.

[11] Grimwood K, Kyd JM, Owen SJ, Massa HM, Cripps AW. Vaccination against respiratory Pseudomonas aeruginosa infection. Hum Vaccin Immunother. 2015;11:14-20.

[12] Priebe GP, Goldberg JB. Vaccines for Pseudomonas aeruginosa: a long and winding road. Expert Rev Vaccines. 2014;13:507-19.

[13] Delany I, Rappuoli R, De Gregorio E. Vaccines for the 21st century. EMBO molecular medicine. 2014;6:708-20.

[14] Worgall S. 40 years on: have we finally got a vaccine for Pseudomonas aeruginosa? Future Microbiol. 2012;7:1333-5.

[15] Sharma A, Krause A, Worgall S. Recent developments for Pseudomonas vaccines. Hum Vaccin. 2011;7:999-1011.

[16] Doring G, Pier GB. Vaccines and immunotherapy against Pseudomonas aeruginosa. Vaccine. 2008;26:1011-24.

[17] Pier GB. Promises and pitfalls of Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide as a vaccine antigen. Carbohydr Res. 2003;338:2549-56.

[18] Lin IY, Van TT, Smooker PM. Live-Attenuated Bacterial Vectors: Tools for Vaccine and Therapeutic Agent Delivery. Vaccines (Basel). 2015;3:940-72.

[19] Locht C, Mielcarek N. Live attenuated vaccines against pertussis. Expert Rev Vaccines. 2014;13:1147-58.

[20] Priebe GP, Meluleni GJ, Coleman FT, Goldberg JB, Pier GB. Protection against fatal Pseudomonas aeruginosa pneumonia in mice after nasal immunization with a live, attenuated aroA deletion mutant. Infect Immun. 2003;71:1453-61.

[21] 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;186:420-7.

[22] Priebe GP, Walsh RL, Cederroth TA, Kamei A, Coutinho-Sledge YS, Goldberg JB, et al. IL-17 is a critical component of vaccine-induced protection against lung infection by lipopolysaccharide-heterologous strains of Pseudomonas aeruginosa. J Immunol. 2008;181:4965-75.

[23] Brockstedt DG, Bahjat KS, Giedlin MA, Liu W, Leong M, Luckett W, et al. Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. Nat Med. 2005;11:853-60.

[24] Sancar A, Sancar GB. DNA repair enzymes. Annu Rev Biochem. 1988;57:29-67.

[25] Wollowitz S. Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. Semin Hematol. 2001;38:4-11.

[26] Dubensky TW, Jr., Skoble J, Lauer P, Brockstedt DG. Killed but metabolically active vaccines. Current opinion in biotechnology. 2012.

[27] Bruhn KW, Birnbaum R, Haskell J, Vanchinathan V, Greger S, Narayan R, et al. Killed but Metabolically Active Leishmania infantum as a Novel Whole-Cell Vaccine for Visceral Leishmaniasis. Clin Vaccine Immunol. 2012;19:490-8.

[28] Skoble J, Beaber JW, Gao Y, Lovchik JA, Sower LE, Liu W, et al. Killed but metabolically active Bacillus anthracis vaccines induce broad and protective immunity against anthrax. Infect Immun. 2009;77:1649-63.

[29] Le Gouellec A, Chauchet X, Laurin D, Aspord C, Verove J, Wang Y, et al. A safe bacterial microsyringe for in vivo antigen delivery and immunotherapy. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2013;21:1076-86.

[30] Le Gouellec A, Chauchet X, Polack B, Buffat L, Toussaint B. Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages. Human vaccines & immunotherapeutics. 2012;8:1454-8.

[31] Chauchet X, Hannani D, Djebali S, Laurin D, Polack B, Marvel J, et al. Poly-functional and long-lasting anticancer immune response elicited by a safe attenuated Pseudomonas aeruginosa vector for antigens delivery. Molecular Therapy — Oncolytics. 2016;3:16033.

[32] Epaulard O, Toussaint B, Quenee L, Derouazi M, Bosco N, Villiers C, et al. Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered Pseudomonas aeruginosa type III secretion system-based vector. Mol Ther. 2006;14:656-61.

[33] Quenee L, Lamotte D, Polack B. Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in pseudomonas aeruginosa. Biotechniques. 2005;38:63-7.

[34] Moser C, Johansen HK, Song Z, Hougen HP, Rygaard J, Høiby N. Chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection is more severe in Th2 responding BALB/c mice compared to Th1 responding C3H/HeN mice. APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 1997;105:838-42.

[35] Stevenson MM, Kondratieva TK, Apt AS, Tam MF, Skamene E. In vitro and in vivo T cell responses in mice during bronchopulmonary infection with mucoid Pseudomonas aeruginosa. Clin Exp Immunol. 1995;99:98-105.

[36] Schoehn G, Di Guilmi AM, Lemaire D, Attree I, Weissenhorn W, Dessen A. Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in Pseudomonas. EMBO J. 2003;22:4957-67.

[37] Liguori L, Lenormand JL. Production of recombinant proteoliposomes for therapeutic uses. Methods Enzymol. 2009;465:209-23.

[38] Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. Nat Methods.

2010;7:447-9.

[39] Hauser AR. The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection. Nat Rev Microbiol. 2009;7:654-65.

[40] Audia JP, Lindsey AS, Housley NA, Ochoa CR, Zhou C, Toba M, et al. In the absence of effector proteins, the Pseudomonas aeruginosa type three secretion system needle tip complex contributes to lung injury and systemic inflammatory responses. PLoS One. 2013;8:e81792.

[41] Milla CE, Chmiel JF, Accurso FJ, VanDevanter DR, Konstan MW, Yarranton G, et al. Anti-PcrV antibody in cystic fibrosis: a novel approach targeting Pseudomonas aeruginosa airway infection. Pediatric Pulmonology. 2014;49:650-8.

[42] Sawa T, Ito E, Nguyen VH, Haight M. Anti-PcrV antibody strategies against virulent Pseudomonas aeruginosa. Hum Vaccin Immunother. 2014;10:2843-52.

[43] Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, et al. Full virulence of Pseudomonas aeruginosa requires OprF. Infect Immun. 2011;79:1176-86.

[44] Mutharia LM, Nicas TI, Hancock RE. Outer membrane proteins of Pseudomonas aeruginosa serotype strains. J Infect Dis. 1982;146:770-9.

[45] 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;61:179-88.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Un second article est actuellement en cours de rédaction concernant l'étude de la métabolomique chez des souris infectées par une souche sauvage de Pa et/ou vaccinées par Pa MMA. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Mme Florence Fauvelle chercheur au GIN (Grenoble Institute Neurosciences). Le but étant de mettre en évidence un set de biomarqueurs de l'hôte infecté, précoces et pronostiques de l'état de santé du patient colonisé à Pa (Figure 1), ou également d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements anti-Pa (Figure 2).

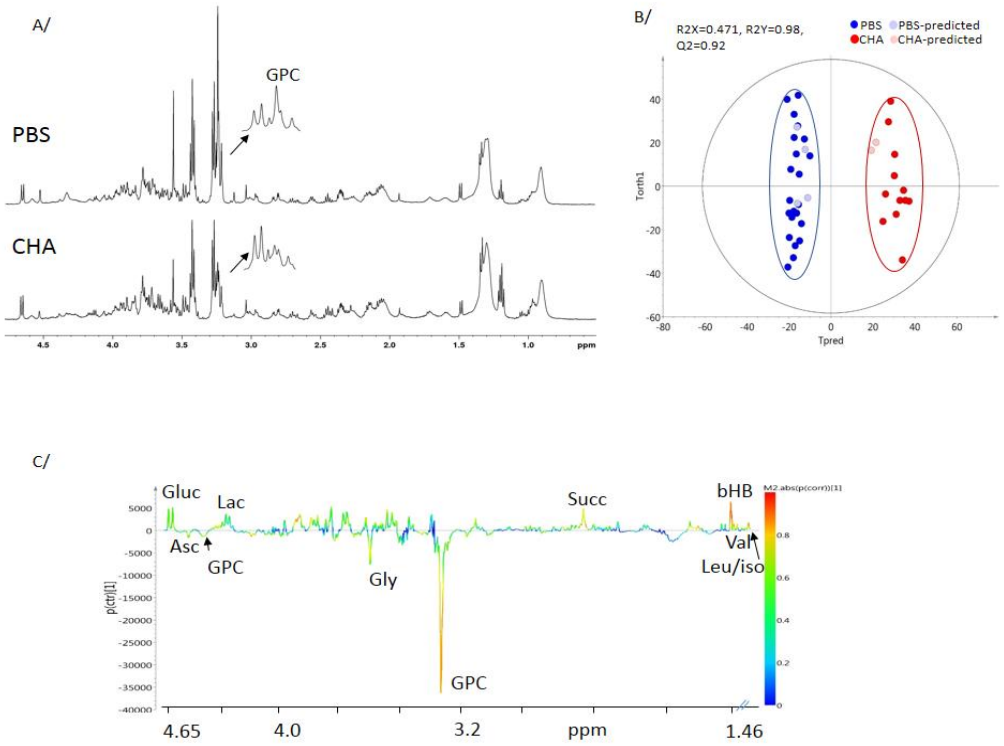


Figure 1. A/HRMAS NMR spectra of intact lung biospies of PBS and CHA infected mice. **B/**Score plot of the CHA-PBS OPLS-DA model built with HRMAS NMR spectra of mouse lung. The CHA infected mice (red) are clearly separated from the PBS one (blue). The model is well fitted and very robust (Q2=0.92) **C/**1D loadings of the model, drawn as S-line, showing metabolites that are increased (positive peaks) or decreased (negative peaks) in CHA infected lung compared to PBS. The most discriminant metabolites that explain the clustering in B/ have high correlation coefficient (in orange).

Gluc: glucose; Asc: ascorbate; GPC: glycerophosphocholine; Gly: glycine; Succ: succinate; bHB: beta-hydroxy-butyrate; Val: valine; Leu/iso: leucine/isoleucine.

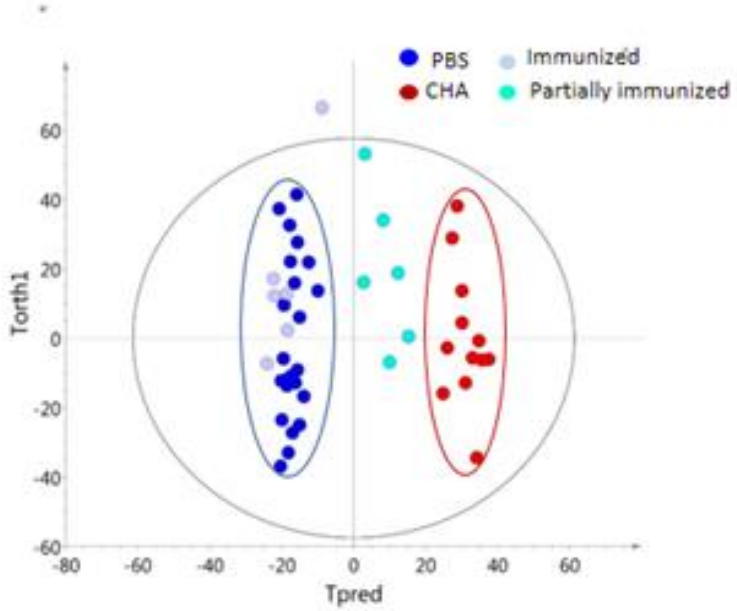


Figure 2. Prediction of treatment efficacy. Two different experiments were performed for immunization of mice with KBMA Pa vaccine and lead to different performance, in term of animal survival.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude est la preuve de concept du développement d'une stratégie vaccinale anti-Pa innovante, à l'heure où Pa est considéré comme le 2ème agent infectieux à combattre par l'OMS du fait d'un niveau de résistance critique aux antibiotiques (14). Ce vaccin a été testé ici dans un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë à Pa pour son efficacité protectrice et sa sécurité d'utilisation.

Nous avons démontré que le vaccin Pa MMA est immunogène puisqu'il entraîne une réponse immune large nécessaire à l'éradication de Pa. Premièrement, la réponse humorale est forte avec un taux d'anticorps important pour deux protéines d'intérêt, OprF et PcrV après addition d'IPTG. Nous savons que de forts taux en anticorps anti-PcrV protègent des infections à Pa. Nous savons également que la porine OprF est un facteur de virulence majeur de Pa génétiquement bien conservé dans les différents sérotypes de Pa. Deuxièmement, la réponse cellulaire engendrée est large avec l'activation de plusieurs voies de l'immunité telles que les voies Th1, Th2, et particulièrement la voie Th17 d'ores et déjà connue comme étant indispensable pour l'éradication de Pa. Le vaccin Pa MMA entraîne une réponse cellulaire T auxiliaire spécifique avec de multiples voies impliquant les sous-types Th17 et Th1, ainsi que des cellules T auxiliaires productrices de TNF-α.

Nous avons montré que ce vaccin vivant atténué par la méthode MMA, qui est incapable de se répliquer chez son hôte, est particulièrement prometteur en terme de sécurité d'utilisation, et a une efficacité protectrice chez la souris lors d'une infection pulmonaire aiguë.

En perspectives de ce travail, il serait judicieux de pousser les investigations quant à la sûreté d'utilisation (le suivi du poids étant peu poussé) ou encore de pharmacocinétique du vaccin. Il serait également intéressant de tester des souches d'autres sérotypes. En effet, même si l'effet sur la réponse humorale (réponse anticorps dirigée contre OprF et PcrV) nous amène à penser qu'il y aura une réponse croisée contre des souches d'autres sérotypes, il faut valider cette hypothèse en testant par exemple la souche PAO1 ou d'autres.

Enfin, pour optimiser l'efficacité vaccinale dans le but d'obtenir la réponse immune la plus large possible, nous avons « modifié » ce vaccin afin qu'il puisse surexprimer de manière contrôlée des effecteurs bénéfiques tels que PopB grâce à la présence du plasmide pEi. Mais à l'avenir, il serait envisageable de faire surexprimer d'autres antigènes d'intérêts comme OprF.

Cette stratégie vaccinale plus sûre d'utilisation de par sa méthode d'atténuation innovante pourrait ainsi être extrapolée à l'humain. Il serait en effet intéressant de pouvoir vacciner précocement les patients atteints de pathologies respiratoires chroniques susceptibles aux infections pulmonaires à Pa, telle que la mucoviscidose, afin d'éviter un déclin accéléré et souvent fatal de leur fonction respiratoire du fait de ces infections opportunistes. Cette vaccination anti-Pa pourrait également s'avérer intéressante chez les patients chroniques de réanimation afin de pallier aux lourdes complications nosocomiales imputables à ce pathogène.

En conclusion, le vaccin Pa MMA est une avancée majeure dans le domaine de la vaccination anti-Pa comme démontré ici dans un modèle murin préclinique.

THESE SOUTENUE PAR : Elodie MEYNET

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

CONCLUSION

Pseudomonas aeruginosa (Pa) est responsable d'une importante morbi-mortalité particulièrement chez les patients atteints de mucoviscidose. Son éradication est difficile du fait d'une grande adaptabilité phénotypique et du développement de résistances aux antibiotiques. Après l'échec de plusieurs vaccins recombinants sollicitant uniquement le versant humoral de la réponse immune, les vaccins vivants atténués attirent l'attention du fait de leur capacité à engendrer une immunité large avec une réponse à la fois humorale et cellulaire, indispensable pour lutter contre ce pathogène.

Dans cette étude, nous avons développé un vaccin anti-Pa innovant et plus sure d'utilisation basé sur une méthode d'atténuation de la bactérie la rendant morte mais métaboliquement active (MMA). Ce Pa MMA présenté ici, a déjà été « modifié » pour sur-exprimer des effecteurs bénéfiques amplifiés par surexpression du système de sécrétion de type 3.

Nous démontrons que Pa MMA entraîne une importante et large réponse humorale chez la souris contre plusieurs antigènes d'intérêt tels que les protéines OprF et PcrV. De plus, nous évaluons les cytokines dans le sérum des souris immunisées et montrons que Pa MMA entraîne une réponse cellulaire Th1, Th2 et surtout Th17. L'implication de la voie Th17 est également confirmée après une stimulation spécifique de cellules T auxiliaires chez les souris immunisées. Pour finir, nous montrons que ce vaccin est sûr d'utilisation et confère une efficacité protectrice dans un modèle murin d'infection pulmonaire aigue.

En conclusion, Pa MMA est une nouvelle plateforme avec un fort potentiel pour le développement d'un vaccin anti-Pa.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 10-05-2017

LE DOYEN
Pr J.P. ROMANET

Pour la Présidente
et par délégation
Le Doyen de Médecine
Pr. Jean-Paul ROMANET

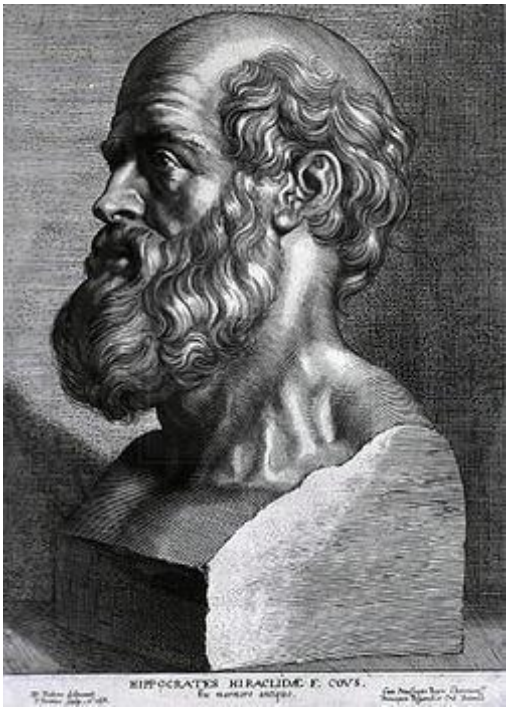
LE PRESIDENT DE LA THESE
Pr C. PISON

BIBLIOGRAPHIE

1. rapport annuel_français 2015_v8.pub - registre_francais_de_la_mucoviscidose_-_bilan_2015_v4.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 19]. Available from: http://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/registre_francais_de_la_mucoviscidose_-_bilan_2015_v4.pdf
2. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls. Pharmacol Ther. 2015 Jan;145:19–34.
3. Frayman KB, Armstrong DS, Carzino R, Ferkol TW, Grimwood K, Storch GA, et al. The lower airway microbiota in early cystic fibrosis lung disease: a longitudinal analysis. Thorax. 2017 Mar 9;
4. Zemanick ET, Hoffman LR. Cystic Fibrosis: Microbiology and Host Response. Pediatr Clin North Am. 2016;63(4):617–36.
5. Murthy SK, Baltch AL, Smith RP, Desjardin EK, Hammer MC, Conroy JV, et al. Oropharyngeal and fecal carriage of Pseudomonas aeruginosa in hospital patients. J Clin Microbiol. 1989 Jan;27(1):35–40.
6. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Oct 15;168(8):918–51.
7. Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M, Alhede M. Pseudomonas aeruginosa biofilms: mechanisms of immune evasion. Adv Appl Microbiol. 2014;86:1–40.
8. Cigana C, Lorè NI, Bernardini ML, Bragonzi A. Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in Pseudomonas aeruginosa Pneumonia. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:852513.
9. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, et al. Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol. 2012 Dec;10(12):841–51.
10. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. Pseudomonas aeruginosa Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. Trends Microbiol. 2016 May;24(5):327–37.
11. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. Microbiol Rev. 1996 Sep;60(3):539–74.
12. Krieg DP, Helmke RJ, German VF, Mangos JA. Resistance of mucoid Pseudomonas aeruginosa to nonopsonic phagocytosis by alveolar macrophages in vitro. Infect Immun. 1988 Dec;56(12):3173–9.
13. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. Future Microbiol. 2010 Nov;5(11):1663–74.
14. WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 19]. Available from: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1
15. Johansen HK, Gøtzsche PC. Vaccines for preventing infection with Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 2015 Aug 23;(8):CD001399.
16. Priebe GP, Goldberg JB. Vaccines for Pseudomonas aeruginosa: a long and winding road. Expert Rev Vaccines. 2014 Apr;13(4):507–19.
17. Worgall S. 40 years on: have we finally got a vaccine for Pseudomonas aeruginosa? Future Microbiol. 2012 Dec;7(12):1333–5.

18. Döring G, Pier GB. Vaccines and immunotherapy against Pseudomonas aeruginosa. Vaccine. 2008 Feb 20;26(8):1011–24.
19. Grimwood K, Kyd JM, Owen SJ, Massa HM, Cripps AW. Vaccination against respiratory Pseudomonas aeruginosa infection. Hum Vaccines Immunother. 2015;11(1):14–20.
20. Delany I, Rappuoli R, De Gregorio E. Vaccines for the 21st century. EMBO Mol Med. 2014 Jun;6(6):708–20.
21. Sharma A, Krause A, Worgall S. Recent developments for Pseudomonas vaccines. Hum Vaccin. 2011 Oct;7(10):999–1011.
22. Pier GB. Promises and pitfalls of Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide as a vaccine antigen. Carbohydr Res. 2003 Nov 14;338(23):2549–56.
23. Schaad UB, Lang AB, Wedgwood J, Ruedeberg A, Que JU, Fürer E, et al. Safety and immunogenicity of Pseudomonas aeruginosa conjugate A vaccine in cystic fibrosis. Lancet Lond Engl. 1991 Nov 16;338(8777):1236–7.
24. Hanessian S, Regan W, Watson D, Haskell TH. Isolation and characterization of antigenic components of a new heptavalent Pseudomonas vaccine. Nature New Biol. 1971 Feb 17;229(7):209–10.
25. Döring G, Meisner C, Stern M, Flagella Vaccine Trial Study Group. A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a Pseudomonas aeruginosa flagella vaccine in cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jun 26;104(26):11020–5.
26. Tart AH, Blanks MJ, Wozniak DJ. The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates. J Bacteriol. 2006 Sep;188(18):6483–9.
27. Wu L, Estrada O, Zaborina O, Bains M, Shen L, Kohler JE, et al. Recognition of host immune activation by Pseudomonas aeruginosa. Science. 2005 Jul 29;309(5735):774–7.
28. Staczek J, Gilleland LB, van der Heyde HC, Gilleland HE. DNA vaccines against chronic lung infections by Pseudomonas aeruginosa. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003 Jul 15;37(2–3):147–53.
29. 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. Nat Med. 1999 Apr;5(4):392–8.
30. Worgall S, Krause A, Rivara M, Hee K-K, Vintayen EV, Hackett NR, et al. Protection against P. aeruginosa with an adenovirus vector containing an OprF epitope in the capsid. J Clin Invest. 2005 May;115(5):1281–9.
31. Cripps AW, Peek K, Dunkley M, Vento K, Marjason JK, McIntyre ME, et al. Safety and immunogenicity of an oral inactivated whole-cell pseudomonas aeruginosa vaccine administered to healthy human subjects. Infect Immun. 2006 Feb;74(2):968–74.
32. Lin IYC, Van TTH, Smooker PM. Live-Attenuated Bacterial Vectors: Tools for Vaccine and Therapeutic Agent Delivery. Vaccines. 2015 Nov 10;3(4):940–72.
33. Locht C, Mielcarek N. Live attenuated vaccines against pertussis. Expert Rev Vaccines. 2014 Sep;13(9):1147–58.
34. Priebe GP, Meluleni GJ, Coleman FT, Goldberg JB, Pier GB. Protection against fatal Pseudomonas aeruginosa pneumonia in mice after nasal immunization with a live, attenuated aroA deletion mutant. Infect Immun. 2003 Mar;71(3):1453–61.
35. 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 Sep 1;186(5):420–7.
36. Priebe GP, Walsh RL, Cederroth TA, Kamei A, Coutinho-Sledge YS, Goldberg JB, et al. IL-17 is a critical component of vaccine-induced protection against lung infection by lipopolysaccharide-heterologous strains of Pseudomonas aeruginosa. J Immunol Baltim Md 1950. 2008 Oct 1;181(7):4965–75.
37. Brockstedt DG, Bahjat KS, Giedlin MA, Liu W, Leong M, Luckett W, et al. Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. Nat Med. 2005 Aug;11(8):853–60.
38. Sancar A, Sancar GB. DNA repair enzymes. Annu Rev Biochem. 1988;57:29–67.
39. Wollowitz S. Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. Semin Hematol. 2001 Oct;38(4 Suppl 11):4–11.
40. Dubensky TW, Skoble J, Lauer P, Brockstedt DG. Killed but metabolically active vaccines. Curr Opin Biotechnol. 2012 Dec;23(6):917–23.
41. Bruhn KW, Birnbaum R, Haskell J, Vanchinathan V, Greger S, Narayan R, et al. Killed but metabolically active Leishmania infantum as a novel whole-cell vaccine for visceral leishmaniasis. Clin Vaccine Immunol CVI. 2012 Apr;19(4):490–8.
42. Skoble J, Beaber JW, Gao Y, Lovchik JA, Sower LE, Liu W, et al. Killed but metabolically active Bacillus anthracis vaccines induce broad and protective immunity against anthrax. Infect Immun. 2009 Apr;77(4):1649–63.
43. Le Gouëllec A, Chauchet X, Laurin D, Aspord C, Verove J, Wang Y, et al. A safe bacterial microsyringe for in vivo antigen delivery and immunotherapy. Mol Ther J Am Soc Gene Ther. 2013 May;21(5):1076–86.
44. Le Gouëllec A, Chauchet X, Polack B, Buffat L, Toussaint B. Bacterial vectors for active immunotherapy reach clinical and industrial stages. Hum Vaccines Immunother. 2012 Oct;8(10):1454–8.
45. Chauchet X, Hannani D, Djebali S, Laurin D, Polack B, Marvel J, et al. Poly-functional and long-lasting anticancer immune response elicited by a safe attenuated Pseudomonas aeruginosa vector for antigens delivery. Mol Ther Oncolytics. 2016;3:16033.



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerais mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

RESUME

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

Pseudomonas aeruginosa (Pa) est responsable d'une importante morbi-mortalité particulièrement chez les patients atteints de mucoviscidose. Son éradication est difficile du fait d'une grande adaptabilité phénotypique et du développement de résistances aux antibiotiques. Après l'échec de plusieurs vaccins recombinants sollicitant uniquement le versant humoral de la réponse immune, les vaccins vivants atténués attirent l'attention du fait de leur capacité à engendrer une immunité large avec une réponse à la fois humorale et cellulaire, indispensable pour lutter contre ce pathogène. Dans cette étude, nous avons développé un vaccin anti-Pa innovant et plus sûre d'utilisation basé sur une méthode d'atténuation de la bactérie la rendant morte mais métaboliquement active (MMA). Ce Pa MMA présenté ici, a déjà été « modifié » pour surexprimer des effecteurs bénéfiques amplifiés ici par surexpression du système de sécrétion de type 3. Nous démontrons que Pa MMA entraîne une forte et large réponse humorale chez la souris contre plusieurs antigènes d'intérêt tels que les protéines OprF et PcrV. De plus, nous évaluons les cytokines dans le sérum des souris immunisées et montrons que Pa MMA entraîne une réponse cellulaire Th1, Th2 et surtout Th17. L'implication de la voie Th17 est également confirmée après une stimulation spécifique de cellules T auxiliaires chez les souris immunisées. Pour finir, nous montrons que ce vaccin est sûr d'utilisation et confère une efficacité protectrice dans un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë. En conclusion, Pa MMA est une nouvelle plateforme avec un fort potentiel pour le développement d'un vaccin anti-Pa.

Killed but metabolically active *Pseudomonas aeruginosa* based-vaccine induces protective humoral- and cell-mediated immunity against *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections

Pseudomonas aeruginosa (Pa) is responsible for an important morbidity and mortality especially in cystic fibrosis patients. Its eradication is difficult because of a huge phenotypic adaptability and the development of antibiotic resistances. After the failure of several recombinant vaccines which solicit only humoral response, live-attenuated vaccines pay attention thanks to their ability to elicit a broad immunity with both humoral- and cell-mediated responses, indispensable to fight against this pathogen. In this study, we developed an innovative and safer live-attenuated Pa vaccine based on killed but metabolically active (KBMA) attenuation method. This KBMA Pa presented here, has been further rationally designed to overexpress beneficial effectors exemplified here by overexpression of the type 3 secretion system apparatus. We demonstrate that KBMA Pa elicit a high and broad humoral response in mice against several antigens of particular interest such as OprF and PcrV proteins. Moreover, we assess cytokines in the serum of immunized mice and we show that KBMA Pa elicit Th1, Th2 and especially Th17 pathways of cell-mediated immune response. Th17 pathway involvement is also confirmed after specific stimulation of helper T cells in immunized mice. Finally, we show that this vaccine is safe and has a protective efficacy in a murine acute pulmonary infectious challenge. In conclusion, KBMA Pa is a new platform with high potential for the development of a vaccine against Pa.

Laboratoire TIMC-IMAG, **CNRS UMR 5525**, équipe TheREx, Université Grenoble Alpes
Faculté de Médecine et Pharmacie de Grenoble, Domaine de la Merci, 38700 LA TRONCHE, France.