



L'ESPOIR FAIT VAINCRE

26ème Colloque Français des Jeunes Chercheurs en mucoviscidose

4 FEVRIER 2025

INSTITUT IMAGINE
24 boulevard du Montparnasse 75015 PARIS

Avec le soutien de notre
partenaire :





Programme

Colloque Français des Jeunes Chercheurs

Mardi 4 février 2025

Institut Imagine, Paris

8:45 - 9:00 **Accueil et mot de bienvenue** : David FIANT, président de Vaincre la Mucoviscidose

9:00 - 9:30 **Conférence d'ouverture** par Geneviève HÉRY-ARNAUD et Jean-Luc MAINARDI :
« *Mucoviscidose et Infections : Quoi de neuf ? et notamment à l'ère des modulateurs de CFTR ?* »

9:30 - 10:30 **Session 1 : « Que cache ce Pseudo ? »**

modérée par : Virginie DOUINE et Romé VOULHOUX

1. BESSE Alison « Identification de régulateurs clés impliqués dans la réduction de la virulence de *P. aeruginosa* en présence d' *A. xylosoxidans* co-isolé d'un patient atteint de mucoviscidose »
2. BORN-BONY Maëlys « *Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) administrées par voie intrapulmonaire améliorent la résolution de l'infection par Pseudomonas aeruginosa et favorisent un phénotype de régulation/réparation* »*
3. REVOL-TISSOT Johan « La Stratégie du Cheval de Troie contre *Pseudomonas aeruginosa* : conception d'un vecteur sidérophore sapable d'utiliser la voie d'import de la mycobactine pour l'adressage d'antibiotiques »
4. LEFEBVRE DELPHINE « *Rôle dans l'infection de deux nouvelles phospholipases antibactériennes du pathogène opportuniste Pseudomonas aeruginosa* »*
5. LE Hung « Développement et application de l'imagerie par spectrométrie de masse pour étudier l'hétérogénéité spatiale des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* »

* : *présentation orale au format ma thèse en 180 secondes + 2 min de questions/réponses*

Pause (15 min)

10:45 - 11:30 **Session posters n°1 (nombres impairs)**

11:30 - 12:15 **Session 2 : « On ne s'inflamme pas ! »**

modérée par : Estelle RUFFIER et Loïc GUILLOT

6. CHABLE DE LA HERONNIERE François « Analyse globale du protéome cytosolique et métabolome des neutrophiles de patients atteints de mucoviscidose et impact du traitement par Kaftrio »
7. CORNELIE Sarahdja « Identification d'un antagoniste du calcium ciblant les VDCC qui limite les dommages inflammatoires en réduisant l'activité calcique épithéliale dans un modèle zebrafish de mucoviscidose »
8. LYKO Camille « Rôle de la protéine CFTR au cours de la microvascularisation pulmonaire mucoviscidosique »

12:15 - 13:30 : Pause déjeuner et photo

13:30 - 14:30 **Session 3 : « Entre l'os et le cerveau, on ne se gène pas ! »**

modérée par : Pascale FANEN et Jean-Christophe PAGES

9. FELGEROLLE Chloé « Conception d'oligonucléotides bloqueurs pour corriger l'effet de mutations du gène CFTR non éligibles aux modulateurs »
10. HAMON Laurine « L'adiposité médullaire osseuse : un acteur dans le déséquilibre de l'homéostasie osseuse chez les patients atteints de mucoviscidose »
11. VALDÉS Loréna « Des études d'association à l'échelle de l'épigénome (EWAS) à l'analyse fonctionnelle des régions différentiellement méthylées dans la mucoviscidose »
12. VELLAT Clotilde « Prédiction des expositions plasmatiques et cérébrales de l'Ivacaftor - Tezacaftor - Elexacaftor chez les personnes atteintes de mucoviscidoses par approches PBPK »

14 :30 - 15:15 **Session posters 2 (nombres pairs)**

15:15 - 16:15 **Session 4 : « Bactéries et champignons : microbes, mi-démons ... »**

modérée par : Jean-Luc MAINARDI et Geneviève HERY-ARNAUD

13. BIGOT Jeanne « Analyse transcriptomique de cellules épithéliales bronchiques primaires de patient atteint de mucoviscidose infectées avec des biofilms d'*Aspergillus fumigatus* et/ou de *Stenotrophomonas maltophilia* »
14. BITAR Maria « Optimisation de la prise en charge des infections dues à *Mycobacterium abscessus* basée sur la synergie entre les β -lactamines et les inhibiteurs de β -lactamases de seconde génération » *
15. CARVALHO Clarisse « Rôle des thiorédoxine réductases TrxR1 et TrxR2 dans la pathogénèse des infections à *Scedosporium apiospermum* »
16. KHAU Sandra « Etude de la régulation de l'inflammasome lors des surinfections bactériennes et fongiques dans la mucoviscidose » *
17. BOULIC Pierrick « Projet BiPlan : études des interactions entre les bactéries des microbiotes pulmonaire et intestinal et les modulateurs du CFTR. »

* : présentation orale au format ma thèse en 180 secondes + 2 min de questions/réponses

Pause 15 min

16:30 - 17:00

Prix Michel Chignard 2025 :

Intervention du lauréat, Benoit BRIARD « Comprendre l'influence de l'environnement pulmonaire et de la mucoviscidose sur les aspergilloses. »

Remise du prix

17:00 – 17:15

Annnonce des lauréats des prix du Colloque 2025 et mot de clôture

Nous remercions notre partenaire pour son soutien à cette journée !



Sommaire

Présentations orales.....	p.1
Posters.....	p.23
Retour en image sur le Colloque des jeunes chercheurs 2024.....	p.56

NOM	Type de recherche	Thématique de recherche	TITRE	Type de présentation	Page
BESSE Alison	Fondamentale	Infection	Identification de régulateurs clés impliqués dans la réduction de la virulence de <i>P. aeruginosa</i> en présence d' <i>A. xylosoxidans</i> co-isolé d'un patient atteint de mucoviscidose	Présentation orale	1
BORN-BONY Maëlys	Fondamentale	Infection	Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) administrées par voie intrapulmonaire améliorent la résolution de l'infection par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et favorisent un phénotype de régulation/réparation.	Ma thèse en 180 sec.	2
REVOL-TISSOT Johan	Fondamentale	Infection	La Stratégie du Cheval de Troie contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Conception d'un Vecteur Sidérophore Capable d'Utiliser la Voie d'Import de la Mycobactine pour l'Adressage d'Antibiotiques	Présentation orale	3
LEFEBVRE Delphine	Fondamentale	Infection	Rôle dans l'infection de deux nouvelles phospholipases antibactériennes du pathogène opportuniste <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ma thèse en 180 sec.	4
LE Hung	Fondamentale	Infection	Développement et application de l'imagerie par spectrométrie de masse pour étudier l'hétérogénéité spatiale des biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Présentation orale	6
CHABLE DE LA HERONNIERE François	Fondamentale	Inflammation	Analyse globale du protéome cytosolique et métabolome des neutrophiles de patients atteints de mucoviscidose et impact du traitement par Kaftrio	Présentation orale	7
CORNELIE Sarahdja	Fondamentale	Inflammation	Identification d'un antagoniste du calcium ciblant les VDCC qui limite les dommages inflammatoires en réduisant l'activité calcique épithéliale dans un modèle zebrafish de mucoviscidose	Présentation orale	8
LYKO Camille	Fondamentale	Inflammation	Rôle de la protéine CFTR au cours de la microvascularisation pulmonaire mucoviscidosique.	Présentation orale	9
FELGEROLLE Chloé	Fondamentale	Thérapie Génique	Conception d'oligonucléotides bloqueurs pour corriger l'effet de mutations du gène CFTR non éligibles aux modulateurs.	Présentation orale	10
HAMON Laurine	Fondamentale	Pathologies Associées	L'adiposité médullaire osseuse : un acteur dans le déséquilibre de l'homéostasie osseuse chez les patients atteint de mucoviscidose	Présentation orale	11
VALDÉS Loréna	Fondamentale	Génétique	Des études d'association à l'échelle de l'épigénome (EWAS) à l'analyse fonctionnelle des régions différentiellement méthylées dans la mucoviscidose	Présentation orale	13
VELLAT Clotilde	Clinique	Fonction CFTR	Prédiction des expositions plasmatiques et cérébrales de l'lvacaftor - Tezacaftor - Elexacaftor chez les personnes atteintes de mucoviscidoses par approches PBPK.	Présentation orale	14
BIGOT Jeanne	Fondamentale	Infection	Analyse transcriptomique de cellules épithéliales bronchiques primaires de patient atteint de mucoviscidose infectées avec des biofilms d' <i>Aspergillus fumigatus</i> et/ou de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Présentation orale	15
BITAR Maria	Fondamentale	Infection	Optimisation de la prise en charge des infections dues à <i>Mycobacterium abscessus</i> basée sur la synergie entre les β -lactamines et les inhibiteurs de β -lactamases de seconde génération	Ma thèse en 180 sec.	16
CARVALHO Clarisse	Fondamentale	Infection	Rôle des thiorédoxine réductases TrxR1 et TrxR2 dans la pathogénèse des infections à <i>Scedosporium apiospermum</i>	Présentation orale	17
KHAU Sandra	Fondamentale	Infection	Etude de la régulation de l'inflammasome lors des surinfections bactériennes et fongiques dans la mucoviscidose	Ma thèse en 180 sec.	19
BOULIC Pierrick	Fondamentale	Infection	Projet BiPlan : études des interactions entre les bactéries des microbiotes pulmonaire et intestinal et les modulateurs du CFTR.	Présentation orale	20

BESSE Alison
Présentation orale

IDENTIFICATION DE REGULATEURS CLES IMPLIQUES DANS LA REDUCTION DE LA VIRULENCE DE P. AERUGINOSA EN PRESENCE D' A. XYLOSOXIDANS CO-ISOLE D'UN PATIENT ATTEINT DE MUCOVISCIDOSE

Alison Besse¹, Quentin Menetrey¹, Raphaël Chiron^{1,2,3}, Virginie Molle⁴, Lucia Grenga⁵, Hélène Marchandin^{1,6}
1 HydroSciences Montpellier, CNRS, IRD, Université de Montpellier
2 Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose, Montpellier
3 Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier
4 DIMNP, CNRS, Université de Montpellier
5 « Innovative technologies for Detection and Diagnostics » CEA- Marcoule, Bagnols-sur-Cèze
6 Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes

Objectifs

La colonisation et la persistance du pathogène *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) au sein des poumons de patients atteints de mucoviscidose (CF) nécessitent la production de divers facteurs de virulence (formation d'un biofilm, motilité, systèmes de sécrétion, production de pyocyanine et sidérophores). Néanmoins, les infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose sont majoritairement polymicrobiennes. Depuis les 15 dernières années, le nombre d'infections chroniques par *Achromobacter xylosoxidans* (Ax) n'a cessé d'augmenter, et cette espèce est de plus en plus co-isolée avec Pa. Cependant, ces interactions inter-espèces restent peu étudiées, et l'impact de Ax sur la virulence de Pa lors de co-infection demeure largement méconnu

Matériels et méthodes

Une souche de Pa (Pall17) et deux souches d'Ax (Ax198 et Ax200), co-isolées d'un patient CF, ont été injectées dans des embryons de poisson-zèbre pour évaluer l'impact d'Ax sur la virulence de Pa. Une analyse protéomique a été réalisée afin d'identifier les protéines de Pa différenciellement représentées entre la mono- et la coculture; et leur implication dans la réduction de certains traits de virulence de Pa a été évaluée par des tests phénotypiques

Résultats

La co-infection avec Pall17 et Ax200 a conduit à une réduction significative de la mortalité des embryons de poisson-zèbre par rapport à une infection avec Pall17 seul. L'analyse protéomique a révélé que 636 protéines étaient moins abondantes en coculture comparativement à la culture seule de Pa. Parmi ces protéines, des régulateurs clés associés aux principaux traits de virulence de Pa étaient significativement sous-représentés (Fur pour la production de sidérophores, FimV pour la formation de biofilm...), supportant les résultats des tests phénotypiques correspondants. Des résultats divergents ont été obtenus avec la paire Pall17-Ax198: aucune différence significative de mortalité entre l'infection mono- et coculture n'a été observée et l'impact sur le protéome de Pa était également moins prononcé (seulement 41 protéines sous-représentées), bien que certains phénotypes de virulence majeurs demeurent atténués (notamment la formation de biofilm et la production de sidérophores)

Discussion et conclusions

Nos résultats indiquent que l'interaction entre Pa et Ax est souche-dépendante. Une réduction de la virulence de Pa a été observée in vivo en présence de Ax, cette dernière affectant simultanément plusieurs facteurs de virulence majeurs de Pa. Il s'agit de la première élucidation des bases moléculaires de l'interaction inter-espèce entre Pa et Ax co-isolés d'un patient atteint de mucoviscidose. Une meilleure compréhension du mécanisme moléculaire à l'origine de l'atténuation de la virulence de Pa lors d'une infection polymicrobienne pourrait permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques

Références

Ce projet est financé par :

BORN-BONY Maëlys
Ma thèse en 180 sec.

LES CELLULES MYELOÏDES SUPPRESSIVES (MDSC) ADMINISTREES PAR VOIE INTRAPULMONAIRE AMELIORENT LA RESOLUTION DE L'INFECTION PAR PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET FAVORISENT UN PHENOTYPE DE REGULATION/REPARATION.

Maëlys Born-Bony¹, Clémentine Cornu¹, Bérengère Villeret¹, Romé Voulhoux², Jean-Michel Sallenave¹

1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1152, Physiopathologie et Épidémiologie des Maladies Respiratoires, Université Paris-Cité, Paris, France

2) Laboratoire de Chimie Bactérienne LCB-UMR7283, CNRS, Aix Marseille Université, IMM, Marseille, France.

Objectifs

Pseudomonas aeruginosa (P.a.) est une bactérie opportuniste qui provoque des infections des voies respiratoires, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose. Cette bactérie provoque une inflammation grave et des lésions tissulaires pouvant entraîner une insuffisance respiratoire et la mort. Ce pathogène est résistant aux traitements antibiotiques et a été classé par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) parmi les pathogènes prioritaires pour la recherche de nouveaux traitements. Des travaux précédents suggèrent un impact bénéfique des cellules myéloïdes régulatrices sur la résolution de l'infection par P.a. Nous avons donc souhaité étudier le rôle des cellules suppressives myéloïdes MDSC, une population myéloïde régulatrice, au cours de l'infection par P.a., ainsi que leur potentiel thérapeutique.

Matériels et méthodes

En utilisant des MDSC différenciées à partir de la moelle osseuse et un nouveau modèle de MDSC différenciées in vitro à partir de cellules ER-Hoxb8, nous avons étudié l'activité de ces cellules lors de l'infection par P.a. (souches cliniques et souches PAO1). Pour cela, nous avons étudié ces cellules par bulk RNA-seq et par des tests fonctionnels (test de réparation tissulaire, inhibition des lymphocytes T). Nous avons ensuite étudié le rôle de ces cellules in vivo, par des expériences de transfert adoptif dans un modèle d'infection pulmonaire par P.a..

Résultats

Par notre étude, nous montrons que l'activité inhibitrice des MDSC est augmentée après infection par P.a.. In vivo, nous avons démontré que le transfert adoptif de MDSC, que ce soit dans un cadre prophylactique ou thérapeutique, améliore la survie des souris après une infection par P.a.. Les études mécanistiques ont montré que le transfert de MDSC induit un environnement pro-régulateur dans le poumon avec une augmentation des niveaux d'IL-10 et de TGF- β dans le lavage broncho-alvéolaire des souris. Ce phénomène s'accompagne d'une réduction de la présence de neutrophiles, d'une augmentation des macrophages régulateurs et lymphocytes T régulateurs dans le poumon. De plus, des analyses histologiques montrent des dommages tissulaires réduits chez les souris ayant reçu des MDSC. Enfin, nous avons confirmé in vitro que le surnageant des MDSC infectées par P.a. favorise la réparation des cellules épithéliales après une blessure mécanique, indiquant un rôle potentiel des MDSC dans la réparation tissulaire in vivo.

Discussion et conclusions

Pour conclure, nous mettons en évidence un rôle bénéfique des MDSC dans la réponse à l'infection par P.a.. Nous pensons que les propriétés uniques des MDSC en font de nouveaux outils thérapeutiques potentiels attrayants pour les patients atteints de maladies inflammatoires aiguës ou chroniques, où l'inflammation doit être maintenue sous contrôle.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Blanche pour Vaincre la Mucoviscidose

REVOL-TISSOT Johan
Présentation orale

LA STRATEGIE DU CHEVAL DE TROIE CONTRE PSEUDOMONAS AERUGINOSA : CONCEPTION D'UN VECTEUR SIDEROPHORE CAPABLE D'UTILISER LA VOIE D'IMPORT DE LA MYCOBACTINE POUR L'ADRESSAGE D'ANTIBIOTIQUES

Johan REVOL-TISSOT, Walid Hajeb, Virginie Will, Isabelle Schalk, Gaëtan Mislin
UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, CNRS, Université de Strasbourg. 300 Boulevard Sébastien Brant, F-67412 Illkirch, Strasbourg, France

Objectifs

Parmi les pathogènes prioritaires, *P. aeruginosa* se distingue par sa forte résistance aux antibiotiques, compliquant le traitement des infections(1), notamment chez les patients atteints de mucoviscidose où il accélère la détérioration pulmonaire(2). Dans ce contexte, le détournement du système d'acquisition du fer via les sidérophores est une stratégie prometteuse dans la stratégie de type Cheval de Troie. *P. aeruginosa* est capable d'utiliser les sidérophores produits par d'autres bactéries via l'expression de systèmes de transport dédiés(3). Ainsi les mycobactines (MYCs), sidérophores produits par les mycobactéries, sont utilisables par *P. aeruginosa* pour subvenir à ses besoins en fer si ceux-ci sont présents dans le milieu extracellulaire. Nous voulons développer des vecteurs mimant la MYC capables de transporter efficacement des antibiotiques dans *P. aeruginosa* voire les mycobactéries, pathogènes critiques pour les patients atteints de la mucoviscidose.

Matériels et méthodes

Un dimère d'acide aeruginosique, nommé BisAA, a été synthétisé autour d'une lysine comme mimétique potentiel de la MYC. Ses propriétés de sidérophore ont été évaluées par protéomique, qRT-PCR et transport de ⁵⁵Fe. Il a été conçu avec l'option favorite d'introduire une fonction alcyne réactive pour une réaction de chimie click par relaxation de cycle tendu (SPAAC) avec des antibiotiques fonctionnalisés par un azoture.

Résultats

Le BisAA, synthétisé en 8 étapes et caractérisé pour valider sa structure chimique, a été confirmé comme vecteur d'adressage d'antibiotiques en dévoyant la voie d'assimilation prévue des MYCs. La structure 3D du complexe BisAA ferrique-FemA montre que notre vecteur est bien reconnu par ce transporteur. De plus, la protéomique a montré qu'il entre dans la bactérie via FemA et qu'il est reconnu par le système de régulation de l'expression des protéines nécessaires à l'assimilation des MYCs. Ces données démontrent que le BisAA mime efficacement les MYCs dans l'adressage d'antibiotiques par la stratégie du Cheval de Troie. Actuellement, des essais de conjugaison sont en cours avec des antibiotiques comme les oxazolidinones, les bêta-lactamines ou la vancomycine.

Discussion et conclusions

Nous avons développé un vecteur mimant un sidérophore et utilisable par *P. aeruginosa* et par les mycobactéries, pathogènes présents parfois en co-infections dans les microbiomes pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose. La voie d'assimilation des MYCs et du BisAA dans *P. aeruginosa* reste cependant encore à déterminer, en particulier la destination finale, périplasmique ou cytoplasmique. C'est une donnée clé pour optimiser la conjugaison d'antibiotiques et l'efficacité antibactérienne. Le but est de développer une stratégie du cheval de Troie afin de surmonter la faible perméabilité de la membrane externe et ainsi améliorer ou restaurer l'efficacité d'antibiotiques de l'arsenal classique et d'autres composés en développement dans notre équipe.

Références

- (1)Wood SJ et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. *Cells*. 2023, 12,199.
- (2)Malhotra S. et al. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clin Microbiol Rev*. 2019, 32,138-218.
- (3)Schalk IJ, Perraud Q. *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environ Microbiol*. 2023, 25,811-831.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal

LEFEBVRE Delphine
Ma thèse en 180 sec.

ROLE DANS L'INFECTION DE DEUX NOUVELLES PHOSPHOLIPASES ANTIBACTERIENNES DU PATHOGENE OPPORTUNISTE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Delphine Lefebvre, Audrey Courbois, Chantal Soscia, Sophie Bleves

1. Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, CNRS et Aix-Marseille Univ, Marseille

Objectifs

P. aeruginosa (PA) est responsable d'infections chroniques sévères chez les patients atteints de la mucoviscidose. Notre équipe s'intéresse au décryptage des mécanismes moléculaires de la virulence de PA et plus particulièrement à l'étude de toxines injectées par le système de sécrétion de type VI (SST6) (1, 2,3), de sorte à révéler de nouvelles cibles innovantes dans la lutte contre la bactérie.

Le but du projet est d'étudier le rôle de deux toxines du SST6 de la famille des Type VI Lipase Effector (Tle), Tle1 et Tle3 (3), que nous avons précédemment caractérisées. PA emploie les Tle pour dégrader la membrane lors de compétitions entre bactéries. Un 1er objectif est i) d'étudier si la bactérie, qui devient majoritaire chez les patients adultes, utilise les toxines Tle1 et Tle3 pour prendre le dessus sur d'autres pathogènes co-existants dans les poumons. Certains Tle ayant aussi un rôle anti-eucaryote en facilitant l'entrée intracellulaire de PA ou en induisant l'autophagie, le 2ème objectif ii) est de tester une éventuelle fonction anti-eucaryote pour Tle1 et Tle3.

Matériels et méthodes

i) La production de Tle1 et Tle3 sera d'abord évaluée par western-blot dans des isolats cliniques (CHU Grenoble). Pour déterminer si Tle1 et Tle3 sont impliquées dans la compétition inter-espèces, des souches de PA WT et mutantes pour *tle1* et *tle3* seront co-cultivées avec *B. cenocepacia*, *S. maltophilia* et *A. xylosoxidans* et les bactéries survivantes seront comptées sur milieu sélectif.

ii) Le rôle de Tle1 et Tle3 dans la pathogénie de PA sera étudiée lors d'infection *ex vivo* de cellules épithéliales par des souches de PA WT ou mutantes *tle1* et *tle3* en réalisant des tests de protection à la gentamicine, la localisation au réticulum endoplasmique de Tle1 et Tle3 et par la détection de marqueurs protéiques de l'autophagie.

Résultats

Nos résultats préliminaires montrent que Tle3 est impliquée dans la compétition inter-espèces entre PA et *B. cenocepacia*. Les tests de compétition réalisés et étendus à 3 autres pathogènes devraient confirmer ces données et révéler un rôle similaire pour Tle1. Tle1 et Tle3 pourraient donc être des toxines antibactériennes utilisées par PA pour prendre le dessus sur ces espèces qu'elle rencontre dans les poumons lors de pluri-infections.

Discussion et conclusions

Ce projet repose sur l'originalité des Tle qui permettraient à PA d'interagir avec deux types de cellules hôtes, d'autres bactéries qu'elle vise à éliminer, et les cellules épithéliales dans lesquelles elle va promouvoir son internalisation ou déclencher l'autophagie. Ce caractère trans-domaine des Tle de PA est unique dans le monde des toxines qui ciblent en général soit d'autres bactéries, soit des cellules eucaryotes.

Grâce à ce projet, des stratégies anti-virulence pourraient être envisagées à plus long terme pour bloquer l'action de ces toxines dans le cadre d'une infection polymicrobienne lors de la colonisation des poumons des patients et plus tard lors de l'échappement au système immunitaire et de la subversion de l'hôte. Il s'agirait alors de pouvoir contrecarrer le pathogène à deux moments clés de son cycle infectieux par un même inhibiteur en désarmant ce pathogène et ainsi en limitant l'apparition de résistance.

Références

- (1) Sana et al., 2012
- (2) Sana et al., 2015
- (3) Berni et al., 2019

- (4) Jiang et al., 2014
- (5) Jiang et al., 2016

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal, Fondation de la Recherche Médicale

LE Hung
Présentation orale

DEVELOPPEMENT ET APPLICATION DE L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE POUR ETUDIER L'HETEROGENEITE SPATIALE DES BIOFILMS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Hung LE, Clément GUILLOU, Marie DRONIOU, Isabelle SCHMITZ, Pascal COSETTE

1. Polymères, Biopolymères, Surfaces (UMR 6270 CNRS), Université de Rouen Normandie, Normandie Université, 76000 Rouen, France

2. INSERM US 51, CNRS UAR 2026, HeRaLeS-PISSARO, Université de Rouen Normandie, Normandie Université, 76000 Rouen, France

Objectifs

Les infections pulmonaires associées aux biofilms posent des défis thérapeutiques chez les patients atteints de mucoviscidose, étant considérées comme la principale cause de mortalité. Cependant, les processus liés à la formation des biofilms et les mécanismes par lesquels les bactéries au sein de ces biofilms développent une tolérance aux traitements antibiotiques demeurent controversés et peu clairs. Dans le but de mieux comprendre l'évolution et l'adaptation des infections bactériennes sous forme de biofilm dans le contexte de la mucoviscidose, notre objectif était d'exploiter l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI en tant que nouvelle technique pour caractériser l'hétérogénéité spatiale des biofilms.

Matériels et méthodes

Des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* ont été cultivés ex vivo sur des tissus pulmonaires de souris, dans un milieu synthétique mimant la composition ionique du crachat des patients atteints de mucoviscidose. Ces biofilms ont ensuite été sectionnés verticalement à l'aide d'un cryostat. Après préparation, les coupes de biofilm ont été déshydratées avant l'application d'une matrice spécifique. Les expériences d'imagerie par spectrométrie de masse ont été réalisées en couplant une source MALDI (AP-MALDI, TransMIT GmbH, Giessen) avec un spectromètre de masse haute résolution (Q-Exactive, Thermo Scientific). Les données brutes obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel SCiLS (Bruker).

Résultats

En raison de la fragilité des biofilms, le protocole de découpe a été étudié et optimisé afin d'obtenir des sections ultrafines tout en préservant leur intégrité ainsi que celle des tissus pulmonaires de souris. De plus, les paramètres d'application de la matrice (durée, concentration, vitesse de pulvérisation, etc.) ont également été ajustés pour garantir une couche homogène sur les échantillons, avec des cristaux de taille inférieure à 10 µm. Ce protocole optimisé de préparation des échantillons a permis de réaliser des acquisitions d'imagerie MALDI de haute qualité, avec une résolution spatiale atteignant jusqu'à 10 µm. Les analyses ont révélé une hétérogénéité spatiale marquée des différentes molécules présentes au sein des biofilms. De plus, les données obtenues ont permis la segmentation des régions d'intérêt dans ces échantillons complexes, ouvrant la voie à une meilleure compréhension des structures et interactions au sein des biofilms.

Discussion et conclusions

Dans cette étude, nous avons démontré l'efficacité de l'imagerie MALDI à haute résolution pour cartographier de petites molécules dans des biofilms de *P. aeruginosa*. Cette approche ne nécessite aucune connaissance préalable des cibles potentielles, ni aucune stratégie de marquage, ce qui lui confère un avantage stratégique par rapport aux méthodologies conventionnelles.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal, Région Normandie

CHABLE DE LA HERONNIERE François
Présentation orale

**ANALYSE GLOBALE DU PROTEOME CYTOSOLIQUE ET METABOLOME DES NEUTROPHILES DE
PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE ET IMPACT DU TRAITEMENT PAR KAFTRIO**

François Chable de la Héronnière¹, Giovanni Saraceni-Tasso¹, Morgane Le-Gall¹, Théo Dhôte^{1,2}, Jérémy Fraering¹, Emilie-Fleur Gautier¹, Ivan Nemzanyy³, Clémence Martin^{1,2}, Pierre-Régis Burgel^{1,2} et Véronique Witko-Sarsat¹

1. Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR8104, Université Paris-Cité, Paris, France

2. Service de Pneumologie & Centre de Référence Maladies Rares Mucoviscidose, site coordonnateur, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris Centre & Université de Paris-Cité, Paris, France

3. Plateforme d'Analyses Métaboliques, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UAR, 3633 Paris, France

Objectifs

La mucoviscidose est caractérisée en partie par un état inflammatoire pulmonaire persistant et hautement délétère pour la fonction respiratoire. Les neutrophiles dominent cet état inflammatoire et présentent eux-mêmes des altérations dans leur phénotype et fonction. On retrouve parmi ces altérations une dérégulation des mécanismes microbicides, un défaut d'apoptose, une augmentation des neutrophiles circulants ayant un phénotype immature et inflammatoire. Récemment, de nouveaux traitements modulateurs de CFTR ont considérablement amélioré la prise en charge de la maladie. Parmi eux, le Kaftrio qui est une combinaison de trois molécules (Elexacaftor, Tezacaftor, Ivacaftor) a montré un bénéfice clinique majeur sur la fonction pulmonaire, ainsi qu'une réduction significative de l'inflammation pulmonaire. Malgré les études existantes concernant l'effet du Kaftrio sur l'inflammation dans la mucoviscidose, son effet sur les neutrophiles reste très peu connu. L'objectif de cette étude est donc de caractériser le protéome et métabolome des neutrophiles de patients par rapport à ceux de donneurs sains et de déterminer l'effet du Kaftrio, dans l'hypothèse où des dérégulations pourraient être corrigées ou non par le traitement.

Matériels et méthodes

Des prélèvements sanguins ont été effectués chez 14 patients atteints de mucoviscidose avant traitement par Kaftrio (1^{ère} visite ou V1) et chez les mêmes patients après plusieurs mois de traitement (2^{ème} visite ou V2) ainsi que chez 12 donneurs sains de l'EFS (HD). Les neutrophiles ont été isolés puis conservés en culot sec pour analyse métabolomique et 8 échantillons de chaque groupe ont été également soniqués dans un tampon adapté. Les protéines cytosoliques ont été ensuite analysées par spectrométrie de masse. Les analyses statistiques et fonctionnelles ont été réalisées grâce aux logiciels Perseus, Metaboanalyst, String, Panther et Ingenuity.

Résultats

Environ 4500 protéines et 120 métabolites ont été identifiés dans les échantillons. Les analyses statistiques ont montré des différences entre HD et V1, avec 558 protéines et 22 métabolites différentiels (p-value < 0.05, Fold-Change < -1.25; > 1.25). De plus fortes différences ont été trouvées entre les cytosols HD et V2 (986 protéines et 20 métabolites différentiels). Entre V1 et V2, des différences ont aussi été observées (247 protéines et 12 métabolites différentiels). Les analyses fonctionnelles ont montré des différences d'enrichissement de voies entre HD/V1 et HD/V2 telles que la régulation de l'apoptose et des voies d'activation et de métabolisme lipidique. Entre V1 et V2, des voies associées à l'activation inflammatoire et à la modulation du cytosquelette ont été mises en évidence.

Discussion et conclusions

Ces analyses couplées nous permettent de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux altérations des neutrophiles dans la mucoviscidose ainsi que l'effet de la prise du traitement Kaftrio sur ces dérégulations. La validation de ces résultats par des techniques conventionnelles nous permettra de mieux cibler des voies d'intérêt telles que le métabolisme lipidique et la régulation de la survie/apoptose.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

CORNELIE Sarahdja
Présentation orale

IDENTIFICATION D'UN ANTAGONISTE DU CALCIUM CIBLANT LES VDCC QUI LIMITE LES DOMMAGES INFLAMMATOIRES EN REDUISANT L'ACTIVITE CALCIQUE EPITHELIALE DANS UN MODELE ZEBRAFISH DE MUCOVISCIDOSE

Sarahdja Cornélie 1, Sylvaine Brandt 1, Georges Lutfalla 1, Andres Floto 2, Stephen Renshaw 3, and Audrey Bernut 1
1. Laboratory of Pathogens and Host Immunity, CNRS (UMR 5294), INSERM (UA 15), University of Montpellier, Montpellier, France.
2. Molecular Immunity Unit, University of Cambridge Department of Medicine, MRC-Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK.
3. The Bateson Centre, Department of Infection, Immunity and Cardiovascular Disease, University of Sheffield Medical School, Sheffield, UK.

Objectifs

Chez les personnes atteintes de mucoviscidose (CF), une maladie résultant de mutations du gène codant le canal CFTR, l'inflammation dominée par les neutrophiles est responsable de lésions pulmonaires et de décès prématurés. Aujourd'hui, la mise en place de thérapies anti-inflammatoires efficaces et accessibles à tous les patients a été entravée par un manque de compréhension des mécanismes précis impliqués dans l'immuno-pathogénèse inflammatoire associée à la maladie. Le rôle délétère du calcium épithélial (Ca^{2+}) a été proposé pour expliquer le phénotype inflammatoire observé dans les voies respiratoires des patients CF. Cependant, les mécanismes par lesquels l'axe CFTR/ Ca^{2+} défectueux contribue à l'inflammation CF restent méconnus. Nous avons donc cherché à: i) élucider comment l'altération de Cftr affecte la signalisation calcique épithéliale et comment les altérations de ce signal seraient impliquées dans l'inflammation CF, et ii) évaluer le potentiel d'antagonistes du calcium pour réduire et prévenir les lésions inflammatoires dans les poumons des patients CF.

Matériels et méthodes

Pour ce faire, nous avons développé et exploité différents modèles de zebrafish dépourvus de Cftr, comme systèmes vertébrés innovants d'immuno-pathologie CF. L'expression de cftr dans les larves de zebrafish a été invalidée via l'utilisation de la technologie morpholino et l'inflammation induite par une blessure aseptique (amputation de la nageoire caudale).

Résultats

Afin de visualiser in vivo l'impact d'un défaut de CFTR sur le signal calcique épithélial au cours de l'inflammation, nous avons généré une lignée transgénique de zebrafish exprimant spécifiquement l'indicateur GCaMP6 dans les cellules épithéliales. En utilisant cet outil, combiné à l'imagerie dynamique, nous avons montré que les larves CF présentaient un flux de calcium anormalement élevé au niveau des blessures par rapport aux animaux contrôle. Point important, l'inhibition génétique et pharmacologique des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (VDCC) a permis de rééquilibrer l'inflammation chez les larves CF en réduisant la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'hypermobilisation des neutrophiles.

Fait remarquable, un antagoniste du calcium connu pour inhiber les VDCC, et utilisé dans le traitement de pathologies cardiaques, a également été capable de rééquilibrer l'inflammation excessive des larves CF en réduisant la surproduction de calcium et de ROS. Ainsi, en réduisant l'inflammation, cette molécule améliore également la réparation tissulaire.

Discussion et conclusions

Nos résultats mettent en évidence le rôle de la signalisation calcique épithéliale dans la pathologie inflammatoire associée à la mucoviscidose, ce qui constitue une cible thérapeutique prometteuse pour prévenir les lésions inflammatoires chez les patients CF, et améliorer ainsi leur qualité et espérance de vie.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal

ROLE DE LA PROTEINE CFTR AU COURS DE LA MICROVASCULARISATION PULMONAIRE MUCOVISCIDOSIQUE.

Camille Lyko¹, Mélanie Boudaud¹, Sarah Fodili¹, Nicolas Lemaître¹, Nadia Alfaïdy¹, Mohamed Benharouga¹.
¹ Laboratoire BioSanté, INSERM U1292, CEA-Grenoble, Université Grenoble Alpes.

Objectifs

La mucoviscidose (MV) est une maladie génétique autosomale et récessive. Le gène responsable de la MV code pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), une glycoprotéine canal chlorure (Cl⁻) exprimée principalement au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. L'absence de l'activité du CFTR est responsable, entre autres, de l'inflammation neutrophilique avec une colonisation bactérienne, touchant principalement les petites voies respiratoires. Les médiateurs inflammatoires et les facteurs de croissance participent à l'infiltration cellulaire, en causant des lésions épithéliales et en augmentant la vascularisation bronchique. Ce dernier processus contribue à augmenter l'entrée portale des cellules inflammatoires. Au niveau des petites voies respiratoires, c'est la microvascularisation qui assure l'approvisionnement des terminaisons tissulaires en O₂, en nutriments et en cas d'inflammation en cellules immunitaires. La microvascularisation est assurée par des cellules endothéliales de petites tailles et dotées d'un fort potentiel de prolifération et de migration. Dans la MV, ces cellules subissent l'effet des facteurs angiogéniques et des médiateurs d'inflammation d'origine épithéliale. Cependant, leurs rôles dans la MV, en lien avec la protéine CFTR et le tissu épithélial restent encore énigmatiques.

Objectif : Déterminer le rôle des cellules endothéliales microvasculaires dans la réponse inflammatoire dans la mucoviscidose en lien avec l'activité du CFTR et le facteur proangiogénique et proinflammatoire de la famille des prokinétines ; PROK1.

Matériels et méthodes

Nous avons utilisé les cellules endothéliales microvasculaires humaines (HPMEC) pour étudier l'effet de l'activité du CFTR sur la résistance transendothéliale (RTE), la perméabilité cellulaire, la réponse inflammatoire, la production de facteurs proangiogéniques et l'infiltration neutrophilaire, ainsi que sur l'expression des protéines des complexes jonctionnels. Nous avons aussi étudié l'effet de CFTR en inhibant son activité ou en invalidant l'expression de son gène par la méthode de CRISPR, le comportement endothélial des cellules HPMEC. Cette étude a été réalisée sur des cellules cultivées, 1 jour (j), 3j et 11j pour mimer leur comportement au cours de la microvascularisation

Résultats

Nous avons démontré que la protéine CFTR est exprimée dans les cellules HPMEC et qu'elle est fonctionnelle. Nous avons montré que l'inhibition de son activité ou l'invalidation de l'expression de son gène augmentent la perméabilité, diminuent la RTE, augmentent la sécrétion des facteurs proinflammatoires et diminuent l'expression de certaines protéines des complexes jonctionnels. Nous avons aussi démontré que la prolifération ainsi que la migration sont dépendantes du CFTR.

Discussion et conclusions

L'ensemble de nos résultats démontre pour la première fois que la microvascularisation associée à la MV est étroitement liée à l'expression et à l'activité du CFTR. La présence d'un facteur proangiogénique et proinflammatoire comme PROK1 augmente ce processus et participe à la transcytose des neutrophiles.

Références

Ce projet est financé par : GRAL

FELGEROLLE Chloé
Présentation orale

CONCEPTION D'OLIGONUCLEOTIDES BLOQUEURS POUR CORRIGER L'EFFET DE MUTATIONS DU GENE CFTR NON ELIGIBLES AUX MODULATEURS.

C. Felgerolle (1), K. Deletang (1), M. Taulan-Cadars (1)
1. Phymedexp, Inserm U1046, CNRS UMR 9214, Université de Montpellier

Objectifs

La majorité des patients CF porteurs de mutations non-sens ou affectant les mécanismes d'épissage n'est pas éligible aux modulateurs de CFTR. Nos travaux se concentrent sur la conception d'oligonucléotides antisens bloqueurs (Target Site Blockers, TSB) pour contrer spécifiquement les effets de ces mutations. D'une part des TSB ciblant des sites clés de la partie 3'UTR de l'ARNm CFTR, jouant un rôle stabilisateur de ces ARNm, même s'ils sont porteurs de codons stop prématurés. Ces TSB permettraient d'améliorer l'effet de molécules de translecture sur ces mutations non-sens. D'autre part, des TSB se liant aux pré-ARNm CFTR en ciblant spécifiquement des mutations d'épissage. Celles-ci renforcent ou créent un site donneur ou accepteur d'épissage, induisant des épissages aberrants lors de la maturation du pré-ARNm CFTR, ce qui aboutit le plus souvent à l'inclusion d'un pseudo-exon dans l'ARNm produit.

Matériels et méthodes

Les TSB stabilisateurs sont testés sur des lignées de cellules pulmonaires génétiquement éditées pour porter une des mutations non-sens étudiée. Dans un premier temps, leur efficacité est quantifiée par RT-qPCR et Western-blot. Pour évaluer l'efficacité des TSB ciblant les mutations d'épissage, visant à empêcher l'inclusion des pseudo-exons, nous avons développé de nouveaux minigènes contenant la séquence du gène de la Luciférase Firefly dont la séquence codante est interrompue par la séquence intronique CFTR à étudier. La luciférase firefly n'est ainsi exprimée qu'à condition d'un épissage normal de l'intron. Ces plasmides permettent un screening plus rapide des TSB pour chaque mutation intronique étudiée, ainsi qu'une quantification de leur efficacité, et nous permettent d'optimiser plus rapidement ces TSB.

Résultats

Les TSB ciblant l'extrémité 3'UTR des ARNm CFTR sont efficaces pour augmenter significativement le taux d'ARNm CFTR porteurs de 2 mutations non-sens (Y122X et G542X), ce qui permettrait une action plus efficace des molécules de translecture. Nous nous concentrons maintenant sur l'impact au niveau protéique des TSB associés à des molécules de translecture, ainsi qu'à leur méthode d'internalisation. De même, la stratégie oligonucléotidique s'est révélée efficace dans le cas de plusieurs mutations d'épissage, avec une augmentation de 20 à 90% du taux d'ARNm de taille normale. Ces résultats encourageants portent maintenant à optimiser les TSB pour augmenter leur efficacité, en améliorant leur capacité à se fixer de manière stable sur le pré-ARNm ciblé, mais aussi leur taux d'internalisation, ainsi que minimiser leur toxicité. Pour ce faire, nous agissons sur la composition des nucléotides constitutifs des TSB en y apportant des modifications chimiques. Nos expériences consistent à faire varier la proportion de nucléotides modifiés et leurs positions dans les TSB, pour différentes modifications chimiques (Locked Nucleic Acid, LNA ; O-Methoxyethyl, OME ; O-Methyl, OM). Les résultats montrent une efficacité augmentée pour les TSB-LNA optimisés en diminuant le nombre de nucléotides modifiés. Nous nous concentrons maintenant sur les méthodes d'internalisation des TSB.

Discussion et conclusions

La conception d'oligonucléotides bloqueurs est une stratégie qui semble efficace contre des mutations non éligibles aux modulateurs de CFTR.

Ce travail a fait l'objet d'un soutien par l'Association Vaincre la Mucoviscidose

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Blanche pour Vaincre la Mucoviscidose

L'ADIPOSITE MEDULLAIRE OSSEUSE : UN ACTEUR DANS LE DESEQUILIBRE DE L'HOMÉOSTASIE OSSEUSE CHEZ LES PATIENTS ATTEINT DE MUCOVISCIDOSE

Laurine Hamon 1, Claire Dumortier 1,2, Johan Sergheraert 1,3, Christophe Chauveau 4, Sophie C. Gangloff 1, Denise Al Alam 2, Marie-Laure Jourdain 1,3, Frédéric Velard 1

1 Université de Reims Champagne-Ardenne, BIOS, Reims, France

2 The Lundquist Institute, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA, USA

3 Université de Reims Champagne-Ardenne, CHU Reims, BIOS, Pôle de Médecine Bucco-Dentaire, UFR Odontologie, Reims, France

4 Université du Littoral Côte d'Opale, ULR 4490 MabLab, Boulogne-sur-mer, France

Objectifs

La maladie osseuse liée à la mucoviscidose (CFBD) concerne 50% des patients adultes CF. Or, il existe une corrélation inverse entre une faible densité minérale osseuse et un taux accru d'adiposité médullaire dans de nombreux contextes d'érosions osseuses, y compris l'ostéoporose post-ménopause (Rozman, 1989 ; Verma, 2002 ; Zhou, 2008 ; Piccinin, 2014). Les ostéoblastes CF obtenus à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) présentent un phénotype altéré comparativement aux cellules saines, couplé à un niveau plus élevé de PPARG (facteur adipogénique). L'hypothèse suggérée serait donc que les mutations du gène CFTR orienteraient préférentiellement les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse (CSMMO) vers un profil adipocytaire, au détriment des ostéoblastes. A l'heure actuelle, l'implication de l'adiposité médullaire dans le déséquilibre de l'homéostasie osseuse chez les patients atteints par la mucoviscidose n'a jamais été étudiée.

Matériels et méthodes

Les CSMMO de patients non-CF (n=7) ont été différenciées, ou non, pendant 21 jours en adipocytes et ostéoblastes, avec ou sans inhibiteurs pharmacologiques de CFTR (INH172 ou BPO27). La présence d'adipocytes au sein des cultures a été évaluée par colorations Oil Red O et BodipyTM, et immunomarquages dirigés contre PPARG et FABP4. La nature des lipides a été obtenue par microscopie RAMAN. Des souris F508delCFTR (n=13) et des souris sauvages (WT) (n=6) âgées de 8 semaines ont subi ou non une ovariectomie (OVX). Après 16 semaines post-chirurgie, des analyses de la microarchitecture osseuse ont pu être réalisées par microCT sur 4 souris CF (2 OVX, 2 sham) versus 2 WT (1 OVX, 1 sham), en attendant l'étude des souris complémentaires. Ces résultats seront consolidés dans les prochaines semaines pour atteindre 10 animaux par groupe.

Résultats

Dans les cultures d'ostéoblastes et de CSMMO sans facteurs pro-différenciants, mais en présence des inhibiteurs, nous observons la formation de gouttelettes lipidiques au sein de ces cellules. Additionné à cela, le nombre et la taille des adipocytes formés sont d'autant plus importants avec INH172 ou BPO27 ($p < 0.05$ vs contrôle). La spectroscopie RAMAN indique une hausse du degré de saturation des lipides intracellulaires. In vivo, les données préliminaires montrent une épaisseur trabéculaire diminuée chez les souris CF comparativement aux souris sauvages, témoin de l'altération de la microarchitecture de l'os chez ces souris CF. Nous montrons également une tendance à la baisse de la densité minérale osseuse lors d'une ovariectomie au sein des souris CF. De plus, le nombre de travées osseuses diminue et l'espacement trabéculaire qui augmente chez les souris OVX CF comparé aux souris CF. Ces données devront être consolidées pour qu'il soit possible de conclure définitivement.

Discussion et conclusions

Ces résultats suggèrent un lien entre la perte de fonction de CFTR et l'adipogénèse. Au niveau médullaire osseux, chez les patients CF, ceci pourrait avoir un impact conséquent sur le déséquilibre de l'homéostasie tissulaire. In vivo, nos premières données attestent d'une altération osseuse chez des souris CF. Une manifestation d'autant plus prononcée chez des souris OVX CF, mimant le phénomène d'ostéoporose post-ménopause chez la femme. Par conséquent nos données tendent à mettre en lumière une aggravation de la

dégénérescence osseuse dans le contexte de la mucoviscidose. In fine, comprendre la formation et le rôle des adipocytes dans ce contexte permettrait de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques restaurant un statut osseux satisfaisant chez les patients, stratégies qui pourraient également s'élargir à un éventail de personnes souffrant de diverses pathologies érosives osseuses.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

DES ETUDES D'ASSOCIATION A L'ECHELLE DE L'EPIGENOME (EWAS) A L'ANALYSE FONCTIONNELLE DES REGIONS DIFFERENTIELLEMENT METHYLEES DANS LA MUCOVISCIDOSE

Loréna VALDÉS (1), Jorg Tost (2), Isabelle Rivals (3), Milena Magalhães (4), Florence Busato (2), Laurent Mely (5), Sylvie Leroy (6), Marlène Murriss (7), Mireille Claustres (4), Davide Caimmi (8), Isabelle Vachier (8), Raphaël Chiron (8) et Albertina De Sario (1)

1. PhyMedExp, CNRS, INSERM, Université Montpellier, Montpellier 2. CNRGH, CEA Evry 3. ESPCI Paris, Université PSL, UMRS1158, Paris 4. LGMR, Montpellier 5. CRCM Hyères 6. CRCM Nice 7. CRCM Toulouse 8. CRCM Montpellier

Objectifs

L'objectif de notre étude est d'identifier des gènes et voies de signalisation impliqués dans la variabilité clinique de la mucoviscidose. Chez les patients CF, la sévérité de l'atteinte pulmonaire varie et dépend autant de facteurs génétiques qu'environnementaux. Afin d'étudier le rôle des facteurs non héréditaires, nous menons des études d'association à l'échelle de l'épigénome dans une cohorte de patients et témoins, ainsi que des analyses fonctionnelles sur des gènes différentiellement méthylés.

Matériels et méthodes

La cohorte MethylCF (51 patients F508del/F508del, 24 témoins) a été réunie par 4 CRCM. La méthylation de l'ADN d'échantillons de sang a été analysée tout-génome par hybridation sur puce et sur des sites CpG sélectionnés par pyroséquençage. Le niveau de transcription a été mesuré par RNAseq et qPCR. Les études fonctionnelles ont été réalisées dans des cellules primaires humaines bronchiques, endothéliales et de lignées (BEAS-2B, THP-1) : test luciférase (gène rapporteur) pour analyser des régions cis-régulatrices (promoteurs, enhancers) in vitro; THP-1 traitées au LPS pour analyser les séquences endogènes.

Résultats

Nous avons montré que la méthylation de l'ADN était fortement altérée dans des échantillons de sang de patients CF. En effet, les gains/pertes de méthylation observés corrélaient avec plusieurs traits phénotypiques (mucoviscidose, VEMS, IMC, diabète). La voie de signalisation JAK/STAT était particulièrement affectée. Cinq sites CpG différentiellement méthylés ont été validés par pyroséquençage. Puisque les changements de méthylation étaient surreprésentés dans des enhancers et promoteurs prédits, des études fonctionnelles ont été réalisées pour déterminer si les changements de méthylation affectaient la transcription des gènes associés. Nous avons montré que les régions différentiellement méthylées associées aux gènes SOCS3, ASPH et RGS1 régulaient un gène rapporteur dans des cellules endothéliales et bronchiques. Ce résultat corrobore leur rôle de séquence cis-régulatrice. Dans des cellules THP1, un traitement au LPS augmentait l'expression de SOCS3 (surexprimé chez les patients CF) et induisait RGS1 (surexprimé chez les patients CF diabétiques), sans provoquer un changement du niveau de méthylation de l'ADN. Ces résultats montrent que SOCS3 et RGS1 sont affectés par l'inflammation et que le changement de méthylation observé chez les patients n'est pas nécessaire à modifier leur expression.

Discussion et conclusions

Les études épigénomiques révèlent de nouveaux gènes associés à des traits cliniques chez les patients atteints de la mucoviscidose. Des analyses fonctionnelles sur des régions différentiellement méthylées prédites comme cis-régulatrices sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

PREDICTION DES EXPOSITIONS PLASMATIQUES ET CEREBRALES DE L'IVACAFTOR - TEZACAFTOR - ELEXACAFTOR CHEZ LES PERSONNES ATTEINTES DE MUCOVISCIDOSES PAR APPROCHES PBPK.

Clotilde Vellat¹, Laurent Bourguignon^{1,3}, Philippe Reix^{1,2}, *Romain Garreau^{1,3}

1 – UMR CNRS 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Université de Lyon, Université Lyon 1, Villeurbanne, France.

2 – Hospices Civils de Lyon, Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose, 69500 Bron, France.

3 – Hospices Civils de Lyon, GH Nord, Service de Pharmacie, Lyon, France.

* Corresponding author: romain.garreau@chu-lyon.fr; phone +33 4 72 07 19 28

Objectifs

Plus de 80% des patients atteints de mucoviscidose sont désormais éligibles au traitement par la trithérapie Elexacaftor – Tezacaftor – Ivacaftor (ETI). Malgré son efficacité clinique majeure, des effets indésirables (EI) d'ordre neurocomportementaux ont été signalés chez environ 25% des patients traités par ETI. Les mécanismes sous-jacents responsables de ces EI demeurent à ce jour inconnus.

Cette étude vise à modéliser la pharmacocinétique (PK) et la diffusion de l'ETI dans le système nerveux central (SNC), par une approche pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK).

Matériels et méthodes

Un modèle PBPK de l'ETI a été construit à l'aide du logiciel PK-Sim®, à partir des caractéristiques physico-chimiques de l'ETI, des données anthropométriques et de profils PK plasmatiques issus de la littérature. Un ajustement des paramètres du modèle a été réalisé pour chaque molécule par méthodes graphiques (comparaison des profils de concentrations observées et prédites) et par quantification des erreurs de prédiction (erreur moyenne, erreur relative). Une validation externe du modèle combinant les 3 molécules prises simultanément a été réalisée.

Résultats

Le modèle final a montré de bonnes capacités prédictives pour chaque molécule, avec une erreur absolue moyenne comprise entre 12 et 17 %. La précision des prédictions à 30 % près pour la triple combinaison était de 92,6 %. Les simulations PK suggèrent que les trois composés diffusent au sein du SNC avec une exposition de respectivement 3,8, 7,2 et 29 mg.h/L pour l'ivacaftor, le tezacaftor et l'elexacaftor.

Discussion et conclusions

Nos simulations montrent qu'une diffusion significative de l'ETI est attendue dans le SNC, avec un ratio SNC/sang atteignant jusqu'à 40 % pour l'elexacaftor. À notre connaissance, il s'agit du premier modèle PBPK corps entier de l'ETI. L'ensemble des validations internes et externes a permis de valider la robustesse du modèle et de l'utiliser pour simuler des profils PK dans différents tissus, dont le SNC. Ce modèle ouvrira la voie à la réalisation d'études complémentaires, via notamment l'intégration de données cliniques de patients pédiatriques présentant des signes d'EI neurocomportementaux. Cela permettra d'analyser les variations d'exposition au niveau du SNC afin d'évaluer dans quelle mesure ces différences pourraient contribuer à expliquer les effets observés.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

BIGOT Jeanne
Présentation orale

ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DE CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES PRIMAIRES DE PATIENT ATTEINT DE MUCOVISCIDOSE INFECTEES AVEC DES BIOFILMS D'ASPERGILLUS FUMIGATUS ET/OU DE STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA

Isabel Valsecchi^{1,*}, Viviane Balloy^{2,*}

*contribution égale, Jeanne Bigot¹, Benjamin Saintpierre³, Juliette Hamroune³, Hasina Ny Aina Rasoamanana¹, Jean Winoc Decousser¹, Françoise Botterel¹

1. Dynamyc, UR 7380, UPEC, EnvA, ANSES, Créteil, France

2. Sorbonne Université, Inserm U938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France.

3. Plate-Forme Séquençage et Génomique (Genom'IC), INSERM U1016, Institut Cochin, 75014 Paris, France

Objectifs

Il est désormais connu que les pathogènes évoluent principalement sous la forme de biofilms mono- et polymicrobiens. Le développement de communautés bactériennes et fongiques dans les voies respiratoires humaines au sein d'un biofilm est complexe. Les patients atteints de mucoviscidose (CF) sont souvent colonisés par des biofilms polymicrobiens bactériens et fongiques. Cependant, la réponse des cellules épithéliales bronchiques (CEB) aux biofilms reste mal comprise. Afin de mieux comprendre l'impact d'une infection polymicrobienne sur la réponse inflammatoire et anti-infectieuse des CEB dans le contexte CF, une analyse transcriptomique de CEB primaires d'un patient CF infecté par un biofilm simple d'*Aspergillus fumigatus* (Af) ou de *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm), ou par un biofilm mixte (Af + Sm) a été réalisée.

Matériels et méthodes

Les cellules épithéliales bronchiques primaires humaines d'un patient CF (CF hPEBC) ont été obtenues auprès d'Epithelix (Suisse). Les cellules cultivées dans des plaques 24 puits ont été infectées pendant 19h avec Af (5×10^4 conidies/puits) ou Sm (5×10^5 CFU/puits), souches obtenues auprès de l'ATCC ou isolées d'un patient CF, pour obtenir des biofilms simples ou mixtes. Les cellules ont été lysées pour extraire les ARN (kit Nucleo spin RNA - Macherey-Nagel). Le séquençage du transcriptome (RNA seq) a été réalisé et analysé par la plateforme GENOM'IC (STAR v2.7.6a et RSEM v1.3.1).

Résultats

Parmi les gènes exprimés par les cellules infectées avec un biofilm mixte, 1326 gènes ont été exprimés indépendamment de la souche (ATCC ou CF), 188 gènes (109 up-régulés et 79 down-régulés) ont été exprimés spécifiquement avec le biofilm mixte ATCC, et 2059 gènes (935 up-régulés et 1124 down-régulés) ont été exprimés spécifiquement avec le biofilm mixte de souches CF. Pour caractériser fonctionnellement ces gènes, une analyse d'enrichissement par processus biologiques des gènes (GO) a été réalisée. Parmi les familles de gènes spécifiquement up-régulés par les biofilms mixtes CF, plus de 350 gènes ont été trouvés dans les familles « processus cellulaires » (GO : 0009987) et « régulation biologique » (GO : 0065007). Plus de 300 gènes ont été retrouvés dans la famille « en réponse à un stimulus » (GO : 0050896) et « processus métabolique ». La famille de gènes « processus biologiques impliqués dans l'interaction inter-espèces entre les organismes » (GO : 0044419), qui compte 22 gènes up-régulés est aussi une famille d'intérêt. Parmi les familles de gènes spécifiquement régulés par les biofilms mixtes ATCC, on retrouve seulement 30 gènes de la famille « régulation biologique » (GO : 0065007) et moins de 20 gènes de la famille « en réponse à un stimulus » (GO : 0050896).

Discussion et conclusions

Ces données nous ont permis d'identifier des voies et des gènes clés impliqués dans l'interaction d'Af et de Sm avec les cellules CF. Ces résultats peuvent aider à mieux comprendre les mécanismes moléculaires régissant la coexistence de ces pathogènes et leur impact sur la progression de l'infection dans la mucoviscidose. Ces gènes seront validés par RT-qPCR et une comparaison avec des cellules non CF complètera ce travail dans le futur.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

BITAR Maria
Ma thèse en 180 sec.

**OPTIMISATION DE LA PRISE EN CHARGE DES INFECTIONS DUES À MYCOBACTERIUM ABSCESSUS
BASEE SUR LA SYNERGIE ENTRE LES β -LACTAMINES ET LES INHIBITEURS DE β - LACTAMASES DE
SECONDE GENERATION**

M. Bitar 1.2.3, M. Arthur 1.2.3 , JL. Mainardi 1.2.3.4

1. INSERM, UMRS1138, Équipe 12 du Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F- 75006, France
2. Sorbonne Université, UMRS 1138, Paris, France
3. Université Paris Cité, UMRS 1138, Paris, France
4. Service de Microbiologie APHP, GHU Paris Centre, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Objectifs

Mycobacterium abscessus est un pathogène opportuniste responsable d'infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose. Le traitement de ces infections repose sur une quadrithérapie, incluant un carbapénème (l'imipénème), dont l'efficacité est faible (25-50%). Il a été démontré que les inhibiteurs de β -lactamases de seconde génération appartenant à la famille des diazabicyclooctanes (DBOs), l'avibactam et le relebactam, améliorent l'efficacité des antibiotiques de la famille des β -lactamines. Nous avons récemment montré un effet synergique in vitro, in vivo, en intracellulaire et sur un panel de souches cliniques entre deux β -lactamines, l'imipénème et l'amoxicilline, en présence de relebactam. Les objectifs en cours sont d'identifier les cibles bactériennes des molécules de la triple association afin de comprendre le mécanisme d'action de cette synergie.

Matériels et méthodes

Les cibles de la triple association imipénème-avibactam-amoxicilline ont été recherchées par sélection de mutants résistants à partir de la souche *M. abscessus* CIP104536 morphotype "S" sur des concentrations croissantes d'imipénème et d'amoxicilline en présence d'une concentration fixe d'avibactam (4 mg/L). L'analyse phénotypique de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu solide et les génomes des mutants obtenus ont été séquencés par la méthode illumina®.

Résultats

À partir de colonies indépendantes, 23 mutants appartenant à neuf séries différentes ont été obtenus en une à quatre étapes. Deux mutants ont été obtenus sur des fortes concentrations d'amoxicilline (4096 mg/L) et d'imipénème (32 mg/L). L'analyse du séquençage de génome n'a pas montré de mutation au niveau des cibles des β -lactamines. Différentes mutations affectant des systèmes d'efflux, de perméabilité, de régulation et de métabolisme ont été mis en évidence. Les premières analyses phénotypiques montrent que les mutants acquièrent une résistance à des antibiotiques appartenant à des familles différentes.

Discussion et conclusions

La sélection de mutants résistants a mis en évidence la possibilité de développer des résistances à la triple association. Cette résistance ne semble pas être associée à des mutations au niveau des cibles des β -lactamines mais à des mutations multiples dont certaines affectant les systèmes d'efflux et de perméabilité membranaire.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal

CARVALHO Clarisse
Présentation orale

ROLE DES THIOREDOXINE REDUCTASES TRXR1 ET TRXR2 DANS LA PATHOGENESE DES INFECTIONS A SCEDOSPORIUM APIOSPERMUM

Clarisse Carvalho, Anaïs Hérivaux, Nicolas Papon, Jean-Philippe Bouchara
Infections Respiratoires Fongiques, Université d'Angers, Angers

Objectifs

L'échappement des champignons à la réponse immunitaire de l'hôte, assurée majoritairement par les cellules phagocytaires, constitue un processus essentiel dans le développement de l'infection. Des travaux antérieurs suggèrent que les deux thiorédoxine réductases TrxR1 et TrxR2 produites par *Scedosporium apiospermum* jouent un rôle important dans la protection du champignon contre les radicaux oxygénés produits par les cellules phagocytaires. Les gènes codant ces enzymes figurent parmi les plus surexprimés en réponse à un stress oxydatif. Néanmoins ces gènes font partie de clusters centrés sur un gène codant une peptide synthétase non ribosomique (NRPS), et assurant la synthèse de peptides non ribosomiques (NRP) de type épithiodioxopipérazine (ETP) comme la gliotoxine qui joue un rôle majeur dans la virulence d'*Aspergillus fumigatus*. Notre objectif était donc de démontrer le rôle des TrxR dans l'échappement de *S. apiospermum* au stress oxydatif et de déterminer si l'action de ces enzymes est directe, par réduction des thiorédoxines oxydées, ou indirecte, via la formation du pont disulfure qui caractérise les ETPs, et qui est considéré comme le support de leur activité rédox.

Matériels et méthodes

Dans ce but, les gènes TRXR1 et TRXR2 codant les thiorédoxine réductases ont été invalidés grâce à la technologie CRISPR-Cas9, de même que les gènes codant les NRPS correspondantes. Une cassette comprenant le gène HPH, et donc conférant la résistance à l'hygromycine B, a été insérée au locus ciblé afin de sélectionner les transformants. Les transformants obtenus ont été validés en vérifiant l'intégration de la cassette en lieu et place du gène cible par amplification par PCR du locus ciblé, et l'absence d'intégration ectopique par Southern blot. Les difficultés liées à cette technique nous ont amenés à développer une méthode alternative basée sur la détermination du nombre de copies du gène HPH par qPCR. Après validation, trois mutants ont été sélectionnés pour chaque gène cible, pour lesquels nous avons vérifié l'absence d'impact de l'invalidation génique sur la morphologie, l'ultrastructure et la croissance, puis évalué la sensibilité aux générateurs de radicaux oxygénés.

Résultats

Si nos premières expérimentations ont permis d'invalider le gène TRXR2, des modifications de notre protocole ont été nécessaires pour les autres gènes cibles, notamment la réduction de la concentration en hygromycine pour la sélection des transformants, les premiers transformants obtenus présentant tous de multiples intégrations ectopiques. Des mutants présentant une seule copie du gène HPH ont ainsi été générés pour chaque gène. Si aucun d'eux ne présente d'altération morphologique ou de retard de croissance, les hyphes des mutants TRXR2^Δ sont dépourvus de couche pariétale externe et présentent une hydrophobicité de la surface cellulaire accrue, mais surtout tous les mutants présentent une sensibilité accrue aux générateurs de radicaux oxygénés, en particulier au cumène, et cet effet est plus prononcé en cas d'invalidation des gènes NRPS1 ou NRPS2.

Discussion et conclusions

Ces résultats confirment l'implication des TrxR dans la protection du champignon contre les radicaux oxygénés, en particulier le cumène qui sollicite surtout les composants du système des thiorédoxines. Par ailleurs, si un rôle direct des TrxR ne peut être écarté, nos résultats montrent qu'il s'agit avant tout d'un rôle indirect via la synthèse de métabolites de type ETP en cours de caractérisation, de même que l'impact de TrxR2 sur l'ultrastructure de la paroi hyphale.

Références

1. Staerck C, et al. Transcriptional profiling of *Scedosporium apiospermum* enzymatic antioxidant gene battery unravels the involvement of thioredoxin reductases against chemical and phagocytic cells oxidative stress. *Med Mycol.* 2019;57:363–373.
2. Le Govic Y, et al. Non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the human pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. *Front Microbiol.* 2019;10:2062.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal

KHAU Sandra
Ma thèse en 180 sec.

ETUDE DE LA REGULATION DE L'INFLAMMASOME LORS DES SURINFECTIONS BACTERIENNES ET FONGIQUES DANS LA MUCOVISCIDOSE

Sandra Khau^{1,2}, Amandine Roussel^{1,2}, Delphine Fouquenot^{1,2}, Margaux Charrier Le Blan^{1,2}, Elise Biquand^{1,2}, Guillaume Desoubreaux^{1,2}, Adélaïde Chesnay^{1,2}, Camille David^{1,2}, Virginie Vasseur^{1,2}, Thomas Baranek^{1,2}, Christophe Paget^{1,2}, Guy Ilango^{1,2}, Loïc Guillot⁴, Viviane B

1. Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, UMR1100, Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), 37012 Tours, France.

2. Faculté de Médecine, Université de Tours, 37012 Tours, France.

3. Sorbonne Université, Inserm U938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), 75012 Paris, France

4. Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics Laboratory (INEM), CNRS Orleans (UMR7355) and University of Orleans, Orleans, France.

Objectifs

Pseudomonas aeruginosa et *Aspergillus fumigatus* sont souvent détectés chez les patients atteints de mucoviscidose. La surinfection par *A. fumigatus* chez des patients colonisés par *P. aeruginosa* provoque une hypersécrétion d'interleukine-1 β (IL-1 β) via l'activation de l'inflammasome. Cette production excessive d'IL-1 β contribue à des lésions pulmonaires et à une réduction des fonctions respiratoires. Ces effets néfastes, liés à la suractivation de l'inflammasome, constituent une menace significative pour les patients atteints de mucoviscidose. Ce projet vise à étudier les mécanismes régulant l'inflammasome lors des surinfections microbiennes

Matériels et méthodes

La régulation de l'inflammasome a été étudiée *in vitro* sur des macrophages issus de moelle osseuse ou alvéolaires murins. Ces macrophages ont été infectés par *P. aeruginosa*, puis par *A. fumigatus*. L'activation de l'inflammasome a été évaluée par le clivage de caspase-1, la sécrétion d'IL-1 β et l'induction de la mort cellulaire. Pour déchiffrer les mécanismes moléculaires de la suractivation de l'inflammasome, nous avons utilisé des macrophages sauvages et transgéniques dépourvus de voies de signalisation immunitaire et de l'inflammasome. Un séquençage ARN a permis d'identifier les gènes régulés en réponse aux infections simples ou combinées. Enfin, l'implication de la protéine CFTR a été examinée en utilisant des macrophages issus de souris *Cftr*^{-/-} et Δ F508d/d.

Résultats

Une primo-infection par *P. aeruginosa* potentialise les macrophages, favorisant la suractivation de l'inflammasome lors de la surinfection par *A. fumigatus*. Cette surinfection entraîne une hyperactivation de l'inflammasome NLRP3, des caspases -1 et -8, ainsi qu'une hypersécrétion d'IL-1 β . Cette réponse est spécifique à une infection primaire par *P. aeruginosa*. Le séquençage ARN a mis en évidence une surexpression des voies liées à l'inflammasome et des cytokines IL-1 lors des surinfections, dépendantes de la voie TLR/MyD88. L'analyse comparative a également révélé un rôle potentiel d'ITGAM (Integrin alpha M). La suractivation est modulée par le canal CFTR, avec une dépendance liée notamment à la classe de mutation du gène *Cftr*.

Discussion et conclusions

Cette étude met en lumière des mécanismes complexes de régulation de l'inflammasome lors des surinfections bactériennes-fongiques dans la mucoviscidose. La potentialisation des macrophages par *P. aeruginosa* induit une suractivation de l'inflammasome NLRP3 et une hypersécrétion d'IL-1 β lors de la surinfection par *A. fumigatus*. Cette activation implique la voie TLR/MyD88, ITGAM et CFTR, avec une modulation selon la classe de mutation du gène *Cftr*. Ces résultats ouvrent la voie à des approches thérapeutiques ciblées pour limiter l'inflammation et préserver la fonction pulmonaire chez ces patients.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal

PROJET BIPLAN : ETUDES DES INTERACTIONS ENTRE LES BACTERIES DES MICROBIOTES PULMONAIRE ET INTESTINAL ET LES MODULATEURS DU CFTR.

Pierrick Boulic, Elena Schneider-Futschik, Danni Li, Yimin Zhu, Juliana Diniz, Cyril Le Ven, Geneviève Héry-Arnaud
UMR 1078, Axe microbiota - CHU de Brest.

Objectifs

Les modulateurs du CFTR tels que la trithérapie Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor ont amélioré la vie des patients atteints de mucoviscidose. Cependant, et bien qu'il s'agisse de médicaments destinés à une population cible, il existe une variabilité interindividuelle dans la réponse au traitement. La mucoviscidose ayant une histoire étroitement liée à son microbiote, nous avons utilisé les principes de la pharmacomicrobiologie pour décrire les interactions possibles entre les modulateurs CFTR et les bactéries du microbiote pulmonaire et intestinal des patients atteints de mucoviscidose. Ainsi nous avons essayé de déterminer si les bactéries issues de ces microbiotes ont un impact sur l'efficacité du médicament.

Matériels et méthodes

Nous avons sélectionné 23 souches bactériennes et les avons inoculées dans des bouillons de culture contenant l'un des trois modulateurs composant la trithérapie ETI. Nous avons ensuite mesuré la croissance bactérienne en densité optique et en numération sur gélose afin de déterminer l'effet des modulateurs sur chaque souche. En parallèle, nous avons dosé les modulateurs au contact des bactéries en utilisant la spectrométrie de masse Multiple Reaction Monitoring, et ainsi déterminer si certaines d'entre elles pouvaient métaboliser les molécules étudiées.

Résultats

Nous avons trouvé plusieurs interactions entre les modulateurs et les bactéries. L'Elexacaftor et l'Ivacaftor ont un effet sur certaines bactéries. L'Elexacaftor favorise la croissance d'E. coli et de P. aeruginosa. L'Ivacaftor a une activité antibiotique sur plusieurs souches, y compris S. aureus et les bactéries anaérobies commensales. En ce qui concerne l'effet des bactéries sur les modulateurs, les trois modulateurs voient leur concentration réduite en leur présence (43% pour l'Elexacaftor $p = 0,02$, 50% pour le Tezacaftor $p = 0,002$, et 44% pour l'Ivacaftor $p = 0,004$). D'après nos observations, plusieurs voies métaboliques semblent possibles en fonction des différentes conditions d'expérimentation (atmosphère, milieu de croissance ...).

Discussion et conclusions

Les interactions entre les modulateurs du CFTR et les bactéries du microbiote des patients atteints de mucoviscidose sont multiples.

L'effet pro-bactérien d'Elexacaftor sur des souches pathogènes ainsi que l'effet antibiotique d'Ivacaftor sur des souches commensales pourraient être délétère pour les patients. Il reste à déterminer si ces effets sont présents in vivo.

La présence de bactérie a un effet sur la concentration de modulateur en condition in vitro. De plus, nous avons pu observer plusieurs types d'interactions. L'action de P. aeruginosa sur ivacaftor a récemment été démontré. Il nous faudra étudier plus précisément chaque interactions présentes dans notre étude afin de caractériser au mieux les mécanismes mis en jeu.

La variabilité de la réponse au traitement peut s'expliquer par ces interactions entre bactéries et modulateurs.

Références

1. Registre français de la mucoviscidose – Bilan des données 2022 Vaincre la Mucoviscidose Paris, septembre 2023
2. Dickinson KM, Collaco JM. Cystic Fibrosis. *Pediatr Rev.* 2021 Feb;42(2):55-67. doi: <https://doi.org/10.1542/pir.2019-0212>
3. Boutin S, Dalpke AH. Acquisition and adaptation of the airway microbiota in the early life of cystic fibrosis patients. *Mol Cell Pediatr.* 2017 Dec;4(1):1. <https://doi.org/10.1186/s40348-016-0067-1>.
4. Price CE, Hampton TH, Valls RA, Barrack KE, O'Toole GA, Madan JC, Coker MO. Development of the intestinal microbiome in cystic fibrosis in early life. *mSphere.* 2023 Aug 24;8(4):e0004623. <https://doi.org/10.1128/msphere.00046-23>.

5. Françoise A, Héry-Arnaud G. The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. *Genes (Basel)*. 2020 May 11;11(5):536. <https://doi.org/10.3390/genes11050536>.
6. Lamoureux, C, Guilloux CA, Beuruelle, C, Jolivet-Gougeon A, & Héry-Arnaud G (2019). Anaerobes in cystic fibrosis patients' airways. *Critical Reviews in Microbiology*, 45(1), 103–117. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1549019>.
7. Heijerman, Harry G MMcCoy, Karen et al. Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*, Volume 394, Issue 10212, 1940 – 1948
8. Marsh R, Santos CD, Yule A, Dellschaft NS, Hoad CL, Ng C, Major G, Smyth AR, Rivett D, van der Gast C. Impact of extended Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor therapy on the gut microbiome in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2024 May 14;S1569-1993(24)00064-X. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2024.05.002>
9. Yi B, Dalpke AH, Boutin S. Changes in the Cystic Fibrosis Airway Microbiome in Response to CFTR Modulator Therapy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Mar 17;11:548613. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.548613>.
10. Reznikov, L.R., Abou Alaiwa, M.H., Dohrn, C.L., Gansemer, N.D., Diekema, D.J., Stoltz, D.A., Welsh, M.J., 2014. Antibacterial properties of the CFTR potentiator ivacaftor. *Journal of Cystic Fibrosis* 13, 515–519. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.02.004>
11. Thakare, R., Singh, A.K., Das, S., Vasudevan, N., Jachak, G.R., Reddy, D.S., Dasgupta, A., Chopra, S., 2017. Repurposing Ivacaftor for treatment of Staphylococcus aureus infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 50, 389–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.020>
12. Alicandro G, Gramegna A, Bellino F, Sciarrabba SC, Lanfranchi C, Contarini M, Retucci M, Daccò V, Blasi F. Heterogeneity in response to Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in people with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2024 May 9;S1569-1993(24)00057-2. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2024.04.013>.
13. Borgo C, D'Amore C, Capurro V, Tomati V, Sondo E, Cresta F, Castellani C, Pedemonte N, Salvi M. Targeting the E1 ubiquitin-activating enzyme (UBA1) improves elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor efficacy towards F508del and rare misfolded CFTR mutants. *Cell Mol Life Sci*. 2022 Mar 16;79(4):192. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04215-3>.
14. Capraro M, Pedrazzi M, De Tullio R, Manfredi M, Cresta F, Castellani C, Averna M. Modulation of Plasmatic Matrix Metalloprotease 9: A Promising New Tool for Understanding the Variable Clinical Responses of Patients with Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulators. *Int J Mol Sci*. 2023 Aug 29;24(17):13384. <https://doi.org/10.3390/ijms241713384>.
15. Saad R, Rizkallah MR, Aziz RK. Gut Pharmacomicrobiomics: the tip of an iceberg of complex interactions between drugs and gut-associated microbes. *Gut Pathog*. 2012 Nov 30;4(1):16. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-4-16>.
16. McDermott, G., Walsh, A., Crispie, F., Frost, S., Greally, P., Cotter, P.D et al., 2024. Insights into the Adolescent Cystic Fibrosis Airway Microbiome Using Shotgun Metagenomics. *IJMS* 25, 3893. <https://doi.org/10.3390/ijms25073893>
17. Enright E.F., Gahan C.G.M, Joyce S.A., and Griffin B.T. 2016. The Impact of the Gut Microbiota on Drug Metabolism and Clinical Outcome. *Yale Journal of Biology and Medicine* 89, pp 375-382
18. Kamath, S., Stringer, A.M., Prestidge, C.A., Joyce, P., 2023. Targeting the gut microbiome to control drug pharmacomicrobiomics: the next frontier in oral drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 20, 1315–1331. <https://doi.org/10.1080/17425247.2023.2233900>
19. Motta H, Reuwsaat JCV, Lopes FC, Viezzer G, Volpato FCZ, Barth AL, de Tarso Roth Dalcin P, Staats CC, Vainstein MH, Kmetzsch L. Comparative microbiome analysis in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Respir Res*. 2024 May 18;25(1):211. <https://doi.org/10.1186/s12931-024-02835-w>
20. Bihler, H., Sivachenko, A., Millen, L., Bhatt, P., Patel, A.T., Chin, J., ..., Mense, M., 2024. In vitro modulator responsiveness of 655 CFTR variants found in people with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* S1569199324000213. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2024.02.006>
21. Ludovico, A., Moran, O., Baroni, D., 2022. Modulator Combination Improves In Vitro the Microheological Properties of the Airway Surface Liquid of Cystic Fibrosis Airway Epithelia. *IJMS* 23, 11396. <https://doi.org/10.3390/ijms231911396>
22. Reyes-Ortega F, Qiu F, Schneider-Futschik EK. Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry for the Drug Monitoring of Ivacaftor, Tezacaftor, and Elexacaftor Treatment Response in Cystic Fibrosis: A High-Throughput Method. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2020 Sep 11;3(5):987-996. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.0c00103>
23. Allen RJ, Waclaw B. Bacterial growth: a statistical physicist's guide. *Rep Prog Phys*. 2019 Jan;82(1):016601. <https://doi.org/10.1088/1361-6633/aae546>.
24. Budha NR, Lee RB, Hurdle JG, Lee RE, Meibohm B. A simple in vitro PK/PD model system to determine time-kill curves of drugs against Mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 Sep;89(5):378-85. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.08.002>.
25. Zhao, Q., Chen, Y., Huang, W. et al. Drug-microbiota interactions: an emerging priority for precision medicine. *Sig Transduct Target Ther* 8, 386 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01619-w>.
26. Cigana, C., Giannella, R., Colavolpe, A., Alcalá-Franco, B., Mancini, G., Colombi, F., ..., Bragonzi, A., 2023. Mutual Effects of Single and Combined CFTR Modulators and Bacterial Infection in Cystic Fibrosis. *Microbiol Spectr* 11, e04083-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04083-22>
27. Schneider, E.K., Azad, M.A.K., Han, M.-L., (Tony) Zhou, Q., Wang, J., Huang, J.X., Cooper, M.A, et al. 2016a. An “Unlikely” Pair: The Antimicrobial Synergy of Polymyxin B in Combination with the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Drugs KALYDECO and ORKAMBI. *ACS Infect. Dis*. 2, 478–488. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00035>
28. Bongiorno R, Ludovico A, Moran O, Baroni D. Elexacaftor Mediates the Rescue of F508del CFTR Functional Expression Interacting with MSD2. *Int J Mol Sci*. 2023 Aug 16;24(16):12838. <https://doi.org/10.3390/ijms241612838>
29. Amico, Brandas, Moran, Baroni, 2019. Unravelling the Regions of Mutant F508del-CFTR More Susceptible to the Action of Four Cystic Fibrosis Correctors. *IJMS* 20, 5463. <https://doi.org/10.3390/ijms20215463>
30. Liu, F., Zhang, Z., Levit, A., Levring, J., Touhara, K.K., Shoichet, B.K., Chen, J., 2019. Structural identification of a hotspot on CFTR for potentiation. *Science* 364, 1184–1188. <https://doi.org/10.1126/science.aaw7611>
31. Bertelsen A, Elborn JS, Schock BC. Microbial interaction: *Prevotella* spp. reduce *P. aeruginosa* induced inflammation in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *J Cyst Fibros*. 2021 Jul;20(4):682-691. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2021.04.012>.
32. Kaftrio, INN-elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (europa.eu)
33. Kandel SE, Tooker BC, Lampe JN. Drug metabolism of ciprofloxacin, ivacaftor, and raloxifene by *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome P450 CYP107S1. *J Biol Chem*. 2024 Aug;300(8):107594. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107594>.
34. Guo Y, Crnkovic CM, Won KJ, Yang X, Lee JR, Orjala J, Lee H, Jeong H. Commensal Gut Bacteria Convert the Immunosuppressant Tacrolimus to Less Potent Metabolites. *Drug Metab Dispos*. 2019 Mar;47(3):194-202. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.084772>.

35. Zhang X, Chen S, Duan F, Liu A, Li S, Zhong W, Sheng W, Chen J, Xu J, Xiao S. Prebiotics enhance the biotransformation and bioavailability of ginsenosides in rats by modulating gut microbiota. *J Ginseng Res.* 2021 Mar;45(2):334-343. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2020.08.001>.
36. Maini Rekdal V, Bess EN, Bisanz JE, Turnbaugh PJ, Balskus EP. Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism. *Science.* 2019 Jun 14;364(6445):eaau6323. <https://doi.org/10.1126/science.aau6323>

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

NOM	Type de recherche	Thématique de recherche	TITRE	N° poster	Page
AGSOUS Salim	Fondamentale	Génétique	GenoMAB : un pipeline génomique pour la résistance antimicrobienne de <i>Mycobacterium abscessus</i>	16	25
BOSC Lola	Fondamentale	Infection	La pathogénicité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dépendante de la pseudopaline	1	26
BOURSIER Angèle	Clinique	Pathologies Associées	Diminution des chances d'extraction épидidymaire de spermatozoïdes dans le contexte de la mucoviscidose : apport des données échographiques	2	27
CELLIER Julie	Fondamentale	Thérapie Cellulaire	Impact de l'acide hyaluronique de bas poids moléculaire sur le défaut de ciliogenèse dans la mucoviscidose	18	28
COSTES Floriane	Fondamentale	Infection	Réponse inflammatoire de l'hôte in vivo suite à l'infection par des isolats de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> issus de patients atteints de mucoviscidose.	17	30
DAMY Louise	Fondamentale	Fonction CFTR	Identification de molécules de translecture pour restaurer la fonction du canal CFTR dans le cadre des mutations de classe I	20	31
DERRIEN Julie	Clinique	Epidémiologie	Progrès majeurs dans la survie des patients atteints de mucoviscidose : 50 ans d'évolution par cohorte de naissance en Bretagne	4	32
DUMAS Théo	Fondamentale	Inflammation	Modulation de l'inflammation en ciblant la protéine anti-inflammatoire TTP	19	33
FRATACCI Alison	Fondamentale	Infection	La protéine chaperon Hsp90 est impliquée dans la pathogénie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	34
GARCIA LABAIG Chloé	Fondamentale	Infection	Mise au point d'un modèle de biofilm mixte <i>M. abscessus</i> / <i>P. aeruginosa</i> pour l'étude de nouveaux composés antibiofilm dans le contexte de la mucoviscidose	5	35
HADJ BOUZID Amel Imene	Fondamentale	Atteinte pulmonaire	Évaluation par CT des méthodes d'apprentissage profond holistiques 2D et 3D pour la segmentation volumétrique des lésions des voies respiratoires et validation longitudinale et multicentrique avec/sans traitement modulateur de la mucoviscidose	6	36
MATHE Hugo	Fondamentale	Pathologies Associées	Impact des modulateurs de CFTR sur le dialogue entre le microbiote et l'épithélium intestinal	8	39
MIENANZAMBI Stecy	Fondamentale	Thérapie Cellulaire	Un modèle d'épithélium bronchique dérivé d'iPSC pour étudier la mutation non-sens Y122X dans la Mucoviscidose	22	40
MILLET Nicolas	Fondamentale	Infection	Rôle d'EphA2 dans les infections à <i>Aspergillus fumigatus</i> et le développement de l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique associée à la mucoviscidose	10	42
MORA Victor	Fondamentale	Infection	Rôle des polyamines dans la virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> au cours de l'infection pulmonaire chronique chez les patients CF	7	43
NAJM Matthieu	Fondamentale	Fonction CFTR	De la CFTR au réseau de signalisation : Une approche de biologie des systèmes pour étudier la mucoviscidose	24	44

NILLY Flore	Fondamentale	Infection	La localisation intracellulaire de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> contribue à la tolérance aux antibiotiques dans un modèle d'infection persistante chez le poisson zèbre	9	45
PAPILLON Mélicca	Fondamentale	Atteinte pulmonaire	Vieillir avec la mucoviscidose : caractérisation de la sénescence des cellules épithéliales bronchiques des patients et impact des nouvelles thérapeutiques ciblant CFTR	12	46
ROCHARD Camille	Fondamentale	Infection	Etude de l'effet antifongique de ETD151 un peptide antimicrobien sur <i>Aspergillus fumigatus</i>	21	48
ROUSSET Aurélia	Fondamentale	Infection	Étude de l'évolution in vivo de <i>P. aeruginosa</i> et de ses interactions avec <i>S. aureus</i>	11	49
SEREME Youssef	Fondamentale	Infection	Caractérisation préclinique d'une souche vaccinale de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in vitro et in vivo chez la souris	13	50
SIMONNEAU Benjamin	Fondamentale	Génétique	Utilisation de l'outil CRISPR/Cas9 pour la construction de lignées iPSC porteuses de mutations de classe I et V de CFTR	26	51
TARDIVY-CASEMAJOR Victor	Fondamentale	Infection	Développement d'anticorps monoclonaux humains à visée thérapeutique ciblant les facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	53
THORAVAL Léa	Fondamentale	Pathologies Associées	Workflow du développement de nouveaux modèles d'étude pour évaluer l'impact d'un défaut de fonction de CFTR sur les ostéocytes.	14	55

GENOMAB : UN PIPELINE GENOMIQUE POUR LA RESISTANCE ANTIMICROBIENNE DE MYCOBACTERIUM ABSCESSUS

Salim Agsous, Kevin La, Pierer Baylac, Zeina Awad, Faiza Mougari, Camille Allam, Emmanuelle Cambau.
Laboratoire du CNR des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux., Paris, France.
IAME,UMR 1137, Paris, France

Objectifs

Mycobacterium abscessus (MAB) est un pathogène opportuniste émergent, en particulier pour les patients souffrant de maladies pulmonaires chroniques tel que la mucoviscidose. MAB est maintenant divisé en 3 sous-espèces (subsp. *abscessus*, *bolletii*, *massiliense*) avec 2 séquences du gène *erm(41)* (*t28* et *c28*). Notre objectif principal est de développer un pipeline bioinformatique pour identifier et interpréter les SNP ou les mutations trouvées dans le génome des isolats cliniques de MAB, permettant ainsi d'adapter le traitement et d'optimiser les résultats cliniques

Matériels et méthodes

Pour ce projet, nous avons déterminé les séquences du génome entier de 173 isolats cliniques (79 subsp. *abscessus* (36 T28 *sequevar* et 36 C28), 24 *bolletii*, 34 *massiliense*). GenoMAB a été conçu sur la base des étapes clés suivantes pour le traitement des données NGS de 65 gènes récemment associés à la résistance aux antimicrobiens dans le MAB : (i) contrôle de la qualité des données de séquençage (FASTQC), (ii) alignement des lectures sur le génome de référence de MAB (RefSeq ATCC 19977), (iii) détection des variants génétiques (SNP, MNP, indels) à l'aide de FreeBayes, (iv) traitement et annotation des variants à l'aide d'un script Python dédié, et (v) construction d'un arbre phylogénétique et d'une analyse MLST à 7 locus afin d'étudier la diversité génétique et l'évolution des souches.

Résultats

Nous avons comparé les mutations détectées à l'aide de GenoMAB avec un autre outil appelé BioNumerics (Biomérieux, Paris, France) et des outils de diagnostic tels que GenoType NTM-DR (Bruker) et le séquençage PCR. GenoMAB a détecté avec succès des mutations précédemment signalées dans les gènes *rrl* (A2058G, A2059C)*, *rrs* (A1408G, G1496T)*, *erm(41)* (T28/C28)**. Il a également révélé de nouvelles mutations dans les gènes restants, qui font l'objet d'une étude de concordance avec les phénotypes résistants, en utilisant l'approche EUCAST. Une page pdf personnalisée a été obtenue pour chaque isolat.

Discussion et conclusions

GenoMAB offre une solution robuste pour la détection des mutations impliquées dans la RAM MAB tout en traitant rapidement les données de séquençage à grande échelle.

Références

Antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus* and treatment of pulmonary and extra-pulmonary infections
10.1016/j.cmi.2023.09.019

LA PATHOGENICITE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA DEPENDANTE DE LA PSEUDOPALINE

1,2 Gomez NO., 3 Sécher T., 1 Bosc L., 1 Ball G., 3 Le Pennec D., 1 Tribout M., 4 Ba M., 5 Bai Y., 6 Ouerdane L., 7 Arnoux P., 5 Lei X., 4 Bordi C., 3 Heuzé-Vourc'h N., 2 Häussler S., 1 Voulhoux R.

1. LCB, CNRS UMR7283, Marseille, France
2. Helmholtz Centre for Infection Research GmbH, Braunschweig, Allemagne
3. CEPR, INSERM, Tours, France
4. LISM, CNRS, Marseille, France
5. Department of Chemical Biology, Pekin, Chine
6. IPREM, CNRS, Pau, France
7. BIAM, CEA Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance, France

Objectifs

Pseudomonas aeruginosa (Pa) est une bactérie pathogène opportuniste infectant jusqu'à 70% des patients atteints de mucoviscidose et causant de graves infections pulmonaires. Afin de contrer la carence en métaux imposée par l'hôte, Pa synthétise, sécrète et récupère de petites molécules à très forte affinité pour ces métaux, les métallobactés. Ainsi, Pa répond à la carence en zinc en sécrétant la pseudopaline (Pp) (1). La voie d'import de zinc par ce zincophore est induite lors d'infections (2,3) et nécessaire à la croissance de Pa dans le mucus pulmonaire (4) et le biofilm (5). L'objectif de cette étude est de démontrer son rôle essentiel lors de l'infection à Pa.

Matériels et méthodes

Les souches PA14WT et PA14ΔcntL sont cultivées en milieu minimum succinate supplémenté en EDTA (milieu MCM) afin d'induire la carence métallique nécessaire à l'activation de la voie. Celle-ci est vérifiée par western-blot avec un anticorps dirigé contre le récepteur CntO. La formation de biofilm est observée en conditions statiques par coloration au crystal violet ou en flux continu avec une souche produisant la GFP de manière constitutive. La quantité de métaux intracellulaire est mesurée par ICP-MS. Les macrophages utilisés sont de lignée RAW 264.7 et cultivés en DMEM avant infection par Pa à MOI 1. Les études in vivo ont été réalisées sur des souris C57BL/6j infectées par voie intratrachéale par PA14WT ou PA14ΔcntOLMI. L'état corporel et la survie des souris ont été suivis plusieurs jours post-infection.

Résultats

Nous avons montré que dans des conditions de carence en zinc telle que celle imposée en MCM, la voie Pp est le mécanisme majoritaire permettant l'import de zinc nécessaire à la croissance de la bactérie. L'absence de la production de Pp impacte la formation de biofilm de manière quantitative mais aussi qualitative puisque la souche PA14ΔcntL forme un biofilm de morphologie différente et plus sensible à la tobramycine. De plus, l'infection de macrophages par la souche PA14ΔcntL révèle un défaut de cytotoxicité, phagocytose, survie intracellulaire et production de cytokines en absence de Pp. Ces résultats révèlent un rôle pléiotrope de la voie dans ce modèle d'infection. L'importance de cette voie a finalement été étudiée in vivo sur un modèle murin d'infection pulmonaire révélant une pathogénicité significativement atténuée en absence de production de Pp.

Discussion et conclusions

Les résultats obtenus démontrent l'importance de la voie Pp pour la virulence de Pa dans les conditions de carence de zinc rencontrées lors de l'infection. En fournissant du zinc à de nombreuses protéines importantes pour la pathogénicité de Pa, la Pp a ainsi un rôle essentiel à différentes étapes de l'infection. Cette voie serait donc une cible intéressante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant Pa, notamment dans un contexte de mucoviscidose.

Références

1. Lhospice S et al., Sci Rep. déc 2017;7(1):17132.
2. Palmer KL, et al., J Bacteriol. août 2005;187(15):5267-77.
3. Bielecki P, et al., PLoS ONE. 12 sept 2011;6(9):e24235.
4. Gi M, et al., Sci Rep. déc 2015;5(1):14644.
5. Gomez NO, et al., Mol Microbiol. janv 2021;115(1):84-98.

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal, ANR

**DIMINUTION DES CHANCES D'EXTRACTION EPIDIDYMAIRE DE SPERMATOZOÏDES DANS LE
CONTEXTE DE LA MUCOVISCIDOSE : APPORT DES DONNEES ECHOGRAPHIQUES**

Angèle Boursier^{1,2}, Léa Van Der Henst³, Augustin Boudry⁴, Aissatu Balde Camara⁵, François Vialard^{5,6}, Adrien Pagin⁷, Anne-Laure Barbotin^{1,2}

1. Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Centre de Biologie Pathologie, Lille
2. INSERM UMR-S1172 – DPNB - Lille
3. Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Centre Hospitalier de Calais
4. ULR2694-METRICS, Université de Lille, Lille
5. Eq RHuMA, UMR-BREED U1198, UFR SVS, UVSQ, Montigny le bretonneux
6. Département de Génétique, CHI de Poissy St Germain en Laye, Poissy
7. Service de Toxicologie et Génopathies, Centre de Biologie Pathologie, Lille

Objectifs

Nous avons déterminé que les chances d'extraction de spermatozoïdes épидидymaires étaient altérées chez les patients atteints de mucoviscidose en comparaison de patients présentant une affection en lien avec le CFTR (CFTR-RD). Parmi les patients atteints de mucoviscidose, ceux dont l'association de variants ne laissait pas présager de l'existence d'une activité résiduelle de la protéine CFTR (CFTR-AR -) présentaient des altérations plus marquées que les patients avec activité résiduelle (CFTR-AR+). Nous souhaitons explorer si cela est en lien avec des phénomènes obstructifs plus marqués sur les voies génitales des patients CFTR-AR- en comparaison des patients CFTR-RD et CFTR-AR + et nous nous sommes donc intéressés aux données d'échographie des voies génitales réalisées chez ces patients

Matériels et méthodes

Étude rétrospective monocentrique des données d'échographie des voies génitales sur la période de 2004 à 2021 concernant les patients atteints de mucoviscidose et CFTR-RD ayant bénéficié d'une chirurgie d'extraction épидидymaire de spermatozoïdes.

Résultats

Les patients du groupe CFTR-AR- présentaient plus fréquemment une dilatation du rete testis à l'échographie avec 58.1 % (25/43) des patients concernés versus 8.3 % (2/24) dans le groupe CF-AR+ et 15.9 % (n=11/72) dans le groupe CFTR-RD ($p < 0.001$). Chez 16.3 % des patients CFTR-AR- (7/43), l'épididyme n'était pas visible à l'échographie (versus 4.2 % (1/24) dans le groupe CFTR-AR+ et 1.4 % (1/72) dans le groupe CFTR-RD, $p = 0.005$).

Il n'existait pas de différence concernant le volume testiculaire, la présence de calcifications intra-testiculaires, la présence d'hydrocèle ou la présence de têtes borgnes épидидymaires de façon bilatérale.

Discussion et conclusions

Nos résultats préliminaires démontrent une atteinte échographique significativement plus importante chez les patients atteints de mucoviscidose sans activité résiduelle (CFTR-AR-). En effet, ils présentent plus fréquemment une dilatation du rete testis et une absence de visualisation de l'épididyme, traduisant de phénomènes obstructifs plus marqués que chez les patients CFTR-AR+ ou CFTR-RD. Ces altérations structurelles des voies génitales pourraient expliquer la diminution des chances d'extraction épидидymaire de spermatozoïdes chez les patients atteints de mucoviscidose sans activité résiduelle. Des analyses de données d'histologie testiculaires sont en cours pour déterminer si une altération de la spermatogenèse existe et constitue une deuxième cause aux résultats d'extraction épидидymaire altérés dans ce groupe.

Références

Ce projet est financé par :

**IMPACT DE L'ACIDE HYALURONIQUE DE BAS POIDS MOLECULAIRE SUR LE DEFAUT DE CILIOGENESE
DANS LA MUCOVISCIDOSE**

Julie CELLIER, Charline Dos Santos¹, Arnaud Bonnomet^{1,2}, Nathalie Lalun¹, Edouard Sage³, Myriam Polette¹, Emilie Luczka¹, Christelle Coraux¹.

1. Inserm UMR-S 1250, P3Cell, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, France

2. Plateforme d'imagerie cellulaire et tissulaire (PICT), Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), Reims, France

3. Département de chirurgie thoracique et de transplantation pulmonaire, Hôpital Foch, Suresnes, France

Objectifs

Dans la mucoviscidose (CF), l'épithélium qui recouvre les voies aériennes supérieures présente un remodelage avec une hauteur épithéliale plus importante, une hyperplasie des cellules basales et des cellules sécrétoires, ainsi qu'une altération du nombre de cellules multiciliées. Ces modifications de la structure de l'épithélium amplifient le défaut de clairance mucociliaire déjà problématique chez les patients CF. L'acide hyaluronique (AH) est un polymère naturel de haut poids moléculaire (PM) pouvant être fragmenté en AH de poids moléculaires inférieurs en cas de lésion ou d'inflammation (Manzanares et al., 2007). C'est un composé biocompatible qui a été identifié, dans sa forme de moyen PM, comme favorisant la différenciation mucociliaire des cellules épithéliales nasales (Huang et al., 2019).

Le but de ce projet est de déterminer la capacité de l'acide hyaluronique (AH) de bas poids moléculaire (PM) à s'opposer au remodelage épithélial, à améliorer la différenciation des cellules ciliées et potentiellement la fonctionnalité des cils moteurs dans le cadre de l'épithélium bronchique CF, afin de déterminer si cette molécule pourrait faire partie de l'arsenal thérapeutique pour la prise en charge des patients.

Matériels et méthodes

Des cellules épithéliales bronchiques de patients CF (F508del/F508del) ont été cultivées en interface air liquide (IAL) pendant 25 jours. Elles ont été traitées ou non avec de l'AH de bas PM (40 kDa), de moyen PM (500 kDa) et de haut PM (1.4 MDa) à différentes concentrations (0,5 mg/mL à 2 mg/mL) à partir du premier jour de culture en IAL. Le remodelage, évalué par la hauteur de l'épithélium, a été déterminé sur des coupes de cultures colorées à l'hématoxyline éosine safran. L'impact de l'AH sur la différenciation des cellules ciliées a été évalué en quantifiant les cellules marquées en immunofluorescence grâce à un anticorps anti-Arl13b. Les ARN totaux ont été extraits des cellules traitées ou non avec l'AH de bas PM à 2 mg/ml afin de réaliser une analyse transcriptomique pour déterminer les gènes modulés par l'AH, en particulier les gènes associés à la ciliogenèse. La fréquence des battements ciliaires a été mesurée par vidéomicroscopie en scrappant les cellules de la culture et en mesurant le battement ciliaire des cellules ciliées actives présentes sur le bord des lambeaux épithéliaux.

Résultats

Les premiers résultats obtenus montrent une absence de remodelage de l'épithélium CF avec une diminution de la hauteur épithéliale dans les cultures traitées avec les AH de 40 kDa et 500 kDa à partir de 1 mg/ml. Nous avons en outre mis en évidence une augmentation significative de la différenciation des cellules ciliées lorsqu'elles sont traitées avec de l'AH de 40 kDa, et ce de manière dose-dépendante. L'analyse du transcriptome et de la fréquence des battements ciliaires sont actuellement en cours.

Discussion et conclusions

En conclusion, nos premiers résultats montrent que l'acide hyaluronique de bas PM améliore le remodelage et la différenciation des cellules ciliées de l'épithélium CF. Les mécanismes impliqués pourront être déterminés grâce à l'analyse transcriptomique. L'AH semble donc être un candidat médicament intéressant en vue d'améliorer la clairance mucociliaire dans la CF.

Références

Manzanares D, Monzon ME, Savani RC, Salathe M. Apical oxidative hyaluronan degradation stimulates airway ciliary beating via RHAMM and RON. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Aug;37(2):160-8. doi: 10.1165/rcmb.2006-0413OC. Epub 2007 Mar 29. PMID: 17395888; PMCID: PMC1976543.

Huang TW, Li ST, Young TH. Chitosan-hyaluronan: promotion of mucociliary differentiation of respiratory epithelial cells and development of olfactory receptor neurons. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019 Dec;47(1):564-570. doi: 10.1080/21691401.2019.1579732. PMID: 30857434.

Ce projet est financé par : Association des amis de l'hôpital américain

COSTES Floriane
Poster 17

REPONSE INFLAMMATOIRE DE L'HOTE IN VIVO SUITE A L'INFECTION PAR DES ISOLATS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISSUS DE PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE.

Floriane Costes (1), Flore NILLY (1), Aurelia Rousset (2), Karen Moreau (2), Anne BLANC POTARD (1)
(1) Laboratory of Pathogens and Host Immunity (LPHI), Montpellier
(2) Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Lyon

Objectifs

Dans de précédents travaux réalisés au sein de notre équipe, un modèle d'infection persistante à *P. aeruginosa* a été établi chez l'embryon de zebrafish, en se basant sur l'utilisation d'isolats de *Pseudomonas aeruginosa* issus de patients atteints de mucoviscidose (CF)¹. L'embryon de zebrafish possède des caractéristiques uniques pour l'étude de la réponse inflammatoire grâce à l'analogie de son système immunitaire inné avec celui de l'Homme et à la possibilité d'imagerie in vivo en temps réel.

Un des objectifs de mon projet de thèse est de caractériser la réponse inflammatoire associée à la persistance de *P. aeruginosa* dans le modèle zebrafish. J'ai également étudié la réponse inflammatoire dans un contexte de co-infection *P. aeruginosa* / *Staphylococcus aureus*. Ces co-infections sont fréquentes chez les patients CF et elles présentent des interactions de type compétition ou coexistence. Nous avons pris avantage du modèle zebrafish pour déterminer comment ces différents profils d'interaction impactent la réponse inflammatoire de l'hôte.

Matériels et méthodes

Pour les études en mono-infection, mon travail s'est basé sur des souches cliniques de *P. aeruginosa* déjà bien caractérisées dans un modèle d'immersion d'embryons blessés, où elles sont soit capables de persister au sein de l'hôte, soit éradiquées en deux ou trois jours. Un protocole de co-infection *P. aeruginosa* / *S. aureus* a été mis en place en se basant sur un trio de souches isolées d'un même patient CF (un isolat *S. aureus*, un isolat *P. aeruginosa* compétitif et un isolat *P. aeruginosa* coexistant). La capacité des souches à persister au sein de l'hôte est évaluée par dénombrement (CFU). L'étude de la réponse inflammatoire de l'hôte en réponse à la mono ou co-infection est permise par l'utilisation d'une lignée rapportrice fluorescente de zebrafish permettant de suivre l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β . L'expression plus globale de plusieurs acteurs de l'inflammation est évaluée par q-RT-PCR après extraction d'ARN sur 10 embryons infectés (à 3h et 20h après infection).

Résultats

Dans notre modèle, en mono-infection, les souches cliniques de *P. aeruginosa* persistantes induisent une réponse inflammatoire forte comparée aux souches qui sont éliminées. Par ailleurs, la co-infection avec *S. aureus*, augmente cette réponse inflammatoire dans le cas de la souche *P. aeruginosa* coexistante (en particulier une augmentation de l'expression de TNF α). Une tendance inverse est observée avec la souche *P. aeruginosa* compétitrice. Des profils similaires sont observés dans un modèle d'infection de cellules humaines, soulignant la pertinence du modèle vertébré non-mammifère zebrafish.

Discussion et conclusions

Une activation de la réponse inflammatoire pourrait favoriser la persistance de *P. aeruginosa* dans notre modèle zebrafish. En complément, il serait intéressant d'étudier le recrutement des neutrophiles et macrophages au site d'infection. De plus, à la vue de nos résultats, nous testons actuellement l'impact de molécules anti-inflammatoires sur la persistance bactérienne.

Références

1. Pont, S. et al. Intracellular *Pseudomonas aeruginosa* persist and evade antibiotic treatment in a wound infection model. 2024.05.15.594279 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.05.15.594279> (2024).

Ce projet est financé par : Ecole doctorale CBS2 de Montpellier

IDENTIFICATION DE MOLECULES DE TRANSLECTURE POUR RESTAURER LA FONCTION DU CANAL CFTR DANS LE CADRE DES MUTATIONS DE CLASSE I

Fredéric Becq, Louise Damy

Christine Barrault
Université de Poitiers - Laboratoire Prédi

Objectifs

Notre projet s'inscrit dans le cadre du consortium Ditcap, et notre objectif d'identifier des molécules de translecture capables de rétablir la fonction du canal CFTR dans le cadre de mutations non-sens (Classe I). Afin d'identifier et de caractériser ces molécules nous mesurons l'activité des variants CFTR exprimés dans différentes lignées cellulaires (FRT) et des cellules primaires pulmonaires.

Matériels et méthodes

Les lignées cellulaires FRT (W1282X, Y122X, R553X, G542X) sont cultivées sur des inserts en interface air liquide pendant 7 jours, lorsque ces cellules sont polarisées nous les traitons avec différentes molécules identifiées comme ayant une activité de translecture. Après 48h de traitement nous pouvons mesurer l'activité du canal CFTR en chambre de Ussing et par Patch Clamp. Nous disposons aussi de cellules pulmonaires primaires issu de patient homozygotes pour deux mutations X (G542/E585X)

Résultats

Les premières molécules testées sont les molécules de 2-6diaminopurine (DAP) et la Clitocine. Les résultats en chambre de Ussing montrent une efficacité de DAP sur les mutations codant pour un codon Stop UGA (W1282X, G542X, R553X), mais DAP semble inefficace sur le mutant Y22X codant pour un codon stop UAA. Cette molécule a été testée en combinaison avec les molécules correctrices et potentiatrices (ETI/VTI), cette association montre une synergie entre la molécule de translecture et les molécules correctrices.

La clitocine, est une molécule de translecture qui n'avait pas encore été testée à notre connaissance sur les variants CFTR de classe 1. Nos résultats montrent les effets de correction sur les 4 variants y compris de Y122X. Elle montre aussi un effet synergique quand elle est associée aux molécules correctrices. Ces résultats obtenus en chambre de Ussing avec la clitocine ont été confirmé par patch Clamp, et montrent bien le potentiel de la Clitocine et de la synergie avec VT.

Des premières expériences sur des cellules primaires pulmonaires homozygotes pour des mutations X, ont été réalisées avec la clitocine et semblent confirmer nos résultats obtenus sur les cellules FRT. Ces résultats montrent que notre approche fonctionne sur ces variants.

Discussion et conclusions

Nous avons déjà obtenu des résultats significatifs et très encourageants pour mieux comprendre les défauts fonctionnels des variants de classe 1 et les effets des molécules de translecture, notamment DAP et Clitocine. Ces effets de translecture sont amplifiés par synergie avec les correcteurs thérapeutiques ET et VT permettant d'envisager une approche thérapeutique combinant ces molécules.

Les premières expériences de Patch clamp ont débuté et confirment les résultats obtenus par chambre de Ussing.

Nous avons validé une partie de ces résultats sur des cellules bronchiques primaires obtenues du Dr Christelle Coraux. Ceux-ci vont dans le bon sens pour les effets correcteurs de la clitocine.

D'autres molécules avec un potentiel de translecture seront caractérisées dans les prochains mois par chambre de Ussing et par Patch Clamp, sur les cellules polarisées FRT et sur des cellules primaires pulmonaires.

Références

Ce projet est financé par : *Vaincre la Mucoviscidose, Blanche pour Vaincre la Mucoviscidose*

DERRIEN Julie
Poster 4

**PROGRES MAJEURS DANS LA SURVIE DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE : 50 ANS
D'ÉVOLUTION PAR COHORTE DE NAISSANCE EN BRETAGNE**

Julie Derrien 1, Carine L'Hostis 1, Marie-Pierre Audrézet 1,2, Sophie Ramel 3, Chantal Belleguic 4, Eric Deneuve 5, Baptiste Arnouat 6, Véronique Storni 6, Marie-Reine Munck 7, Irène Frachon 8, Philippe Vic 9, Rémi Bernard 10, Claude Férec 1, Virginie Scotet 1

1. Inserm, Université de Brest, EFS, UMR 1078, GGB, Brest, France
2. Laboratoire de génétique moléculaire, CHU de Brest, France
3. CRCM, Fondation Ildys, Roscoff, France
4. CRCM, Université de Rennes, CHU de Rennes hôpital Pontchaillou, Rennes, France
5. CRCM, CHU de Rennes hôpital Sud, Rennes, France
6. CRCM, Centre Hospitalier Bretagne Atlantique, Vannes, France
7. Service de pédiatrie, CHU de Brest, France
8. Service de pneumologie, CHU de Brest, France
9. Service de pédiatrie, Hôpital de Cornouaille, Quimper, France
10. Service de pneumologie, Hôpital de Cornouaille, Quimper, France

Objectifs

L'analyse de la survie des patients atteints de mucoviscidose repose généralement sur une méthode transversale permettant uniquement l'estimation d'indicateurs prédits, telle que la médiane de survie prédite. En Bretagne, où la maladie est fréquente (1 / 3 500 naissances), un registre spécifique a pu être mis en place, recensant l'ensemble des patients nés dans la région depuis 1970. Grâce à ce long suivi, ce registre dispose de données uniques permettant l'application d'une méthode longitudinale et l'estimation d'indicateurs réels, comme la médiane de survie réelle. L'objectif de cette étude était d'analyser la survie des patients nés en Bretagne sur la période 1970-2019, par cohorte de naissance.

Matériels et méthodes

Le statut vital a été mis à jour en décembre 2023 via la base de données publique française des décès. La méthode Kaplan-Meier a été utilisée pour tracer des courbes de survie, estimer les probabilités de survie à différents âges et déterminer les médianes de survie réelles. Deux méthodes ont permis de projeter les courbes au-delà de la période de suivi : la première, développée par l'équipe du registre irlandais, consistait à ajuster un modèle de survie paramétrique (Weibull) aux données observées. La seconde, développée par notre équipe, consistait à : 1) déterminer un âge maximum de survie théorique, 2) prolonger la courbe de survie de la cohorte la plus ancienne en tenant compte de cette nouvelle valeur, 3) appliquer un coefficient multiplicateur évolutif en fonction de l'âge aux valeurs de cette nouvelle courbe de référence afin de projeter les courbes de survie des cohortes récentes.

Résultats

Sur les 640 patients nés en Bretagne au cours de la période d'étude, 234 (37 %) étaient décédés à la date de fin. Les probabilités de survie ont augmenté régulièrement et considérablement au fil des décennies. À 20 ans, elle n'était que de 56 % pour la cohorte 1970-79 alors qu'elle était de 96 % pour la cohorte 2000-09. La médiane de survie réelle pour les cohortes 1970-79 et 1980-89 a été estimée respectivement à 24,2 ans et 35,0 ans, des valeurs qui ont pu être prédites avec précision par chacune des méthodes de projection. Pour les cohortes récentes, les projections basées sur la méthode du registre irlandais ont toutefois produit des estimations irréalistes. En revanche, notre méthode a fourni des estimations plausibles, avec des médianes de survie prédites à 67,1 ans pour la cohorte 1990-99, 69,3 ans pour la cohorte 2000-09 et 70,2 ans pour la cohorte 2010-19.

Discussion et conclusions

Cette étude fournit des estimations précises et actualisées, et illustre clairement l'amélioration de la survie par cohorte de naissance. La survie va continuer de s'améliorer avec l'arrivée des modulateurs.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

MODULATION DE L'INFLAMMATION EN CIBLANT LA PROTEINE ANTI-INFLAMMATOIRE TTP

Dumas Théo, Solenne Bleuse (1), Kauthar Zidan (1), Marion Nadaud (1), Caroline Goujon (2) et Magali Taulan-Cadars (1)
1. PhyMedExp, Inserm U1046, CNRS UMR 9214, Université de Montpellier
2. Institut de recherche en infectiologie de Montpellier, IRIM UMR 9004

Objectifs

Bien que les thérapies modulatrices CF montrent une grande efficacité, il existe une inflammation persistante au niveau des voies aériennes. L'inflammation bronchique dans la mucoviscidose est caractérisée par un infiltrat massif de polynucléaires neutrophiles et une surproduction de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8 et l'IL-6. Nous avons précédemment mis en évidence la diminution de l'expression d'une protéine anti-inflammatoire dans des cultures de cellules de patients CF. Cette protéine dégrade les ARNs messager (ARNm), en se fixant sur leur extrémité 3'UTR, codant des facteurs pro-inflammatoires notamment du facteur de nécrose tumorale TNF α et interleukines IL-8 et IL-6. Ces cytokines contribuent à l'élévation du niveau d'inflammation et au recrutement des neutrophiles et macrophages. Afin d'augmenter la quantité protéique de TTP, nous avons ciblé la partie régulatrice 3'UTR de l'ARNm de TTP en utilisant des oligonucléotides afin d'empêcher des éléments répresseurs de s'y fixer. En effet, la région 3'UTR est régulée négativement par la fixation de protéines ou des micro-ARNs (miRs) qui entraînent la dégradation de l'ARNm cible. De manière intéressante, certains de ces miRs sont sur-exprimés dans la mucoviscidose et entraînent une augmentation de la dégradation de l'ARNm TTP, comme les miR-155-5p et 449a.

L'objectif de ce travail va être (1) d'optimiser les TSB déjà identifié (chimie des TSB, méthode d'internalisation) pour augmenter le taux de protéines TTP et/ou d'identifier d'autres TSB, (2) de valider leur efficacité sur des modèles adaptés issus de patients CF.

Matériels et méthodes

L'efficacité des TSB vont être analysés par l'utilisation d'un système de gène rapporteur luciférase dans la lignée immortalisée Beas-2B. L'expression des gènes vont être analysés par PCR quantitative. L'expression protéique de TTP sera mesurée par Western Blot et le dosage des cytokines sera également réalisé.

Résultats

Nous avons précédemment montré que l'augmentation de l'expression de la protéine TTP par un système d'activation grâce à la technique CRISPR est efficace pour diminuer le taux des ARNm des cytokines ciblés. Nous avons ainsi conçu des TSB qui peuvent se fixer sur la partie 3'UTR de l'ARNm TTP. Deux TSB ont permis d'augmenter l'expression de la luciférase qui reflète la stabilisation de la partie 3'UTR de TTP aux concentrations de 50 nM. Dans les cellules CFBE et dans des M1-dérivés de THP1, cette stabilisation du taux d'ARNm et de protéines TTP a également été mesurée. Ce résultat est associé à une diminution de l'expression d'ARNm des interleukines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF α . Le dosage des cytokines est en cours.

Discussion et conclusions

Dans le cadre de ce projet, nous envisageons de mettre en place d'un modèle de culture 3D CF (épithélium ALI) en co-culture avec des macrophages THP-1 (ou de patients CF) et de d'évaluer l'efficacité des TSB sur les niveaux d'ARNm et de protéines TTP et des interleukines dans ces interfaces air-liquides cultivés à partir de cellules de patients CF.

Ce travail devrait nous permettre d'évaluer si la stratégie oligonucléotide est efficace pour stabiliser l'expression d'ARNm TTP, important pour la résolution de l'inflammation dans le contexte CF.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

FRATACCI Alison
Poster 3

LA PROTEINE CHAPERON HSP90 EST IMPLIQUEE DANS LA PATHOGENIE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Alison Fratacci (1,2), Amine Ali-Chaouche (2), Marie Corteggiani (2), Régine Lebrun (3), Sophie Bleves (1), Olivier Genest (2), Bérengère Ize (1).

1. LISM, UMR 7255, IMM, CNRS, Aix Marseille Université, Marseille.
2. BIP, UMR 7281, IMM, CNRS, Aix Marseille Université, Marseille.
3. Plateforme de protéomique, IMM, CNRS, Marseille.

Objectifs

Pendant l'infection, les bactéries font face à de multiples stress en réponse aux défenses de l'hôte. Ces stress affectent l'homéostasie des protéines (également appelée protéostasie), c'est-à-dire l'équilibre entre le repliement et la dégradation des protéines. Pour contrôler la protéostasie, chaque cellule possède des protéines chaperons qui aident au repliement de protéines substrats (aussi appelées clientes) et les protègent de l'agrégation ou de leur dégradation. Hsp90 (« Heat-shock protein of 90 kDa ») est une protéine très conservée faisant partie de la famille des chaperons et qui a récemment été mis en relation avec la virulence de certains agents pathogènes comme *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, le rôle que joue Hsp90 dans les mécanismes de pathogénie reste encore mystérieux (clients, mécanisme moléculaire, etc.). Le but de notre étude est de comprendre le rôle d'Hsp90 dans la physiologie de *P. aeruginosa* et en particulier son implication dans sa pathogénie.

Matériels et méthodes

Une approche de protéomique quantitative a permis de mettre en évidence un lien entre Hsp90 et la biosynthèse de la pyoverdine, un sidérophore majeur de *P. aeruginosa*. L'étude de ce lien a pu être approfondi par l'emploi de méthodes de biologie moléculaire, biochimie, microbiologie et de transcriptomique. Ces approches ont également été utilisées pour réaliser une exploration phénotypique plus globale.

Résultats

La comparaison du protéome total d'une souche sauvage avec celui d'une souche mutante Δ hsp90 a révélé une moindre abondance des 4 enzymes de synthèse peptidique non ribosomique (NRPS) impliquées dans la biosynthèse de la pyoverdine en absence du chaperon Hsp90. Conformément à ces résultats, nous avons ensuite montré que la quantité de pyoverdine produite par *P. aeruginosa* était considérablement réduite en l'absence d'Hsp90, par rapport à la souche WT ou à une souche complémentée. Nous avons ensuite pu démontrer que cette réduction n'est pas à due à une régulation transcriptionnelle ou traductionnelle mais qu'elle résulte plutôt d'une protection des NRPS de la dégradation par des protéases.

Par ailleurs, nous avons également observé que la formation de biofilm, un autre déterminant de la pathogénie de *P. aeruginosa*, était significativement retardée en l'absence d'Hsp90.

Discussion et conclusions

Notre travail pourrait permettre de mieux comprendre le rôle d'Hsp90 chez *P. aeruginosa* et de déterminer s'il pourrait constituer une cible intéressante dans une stratégie d'anti-virulence, proposant ainsi une alternative à l'utilisation massive d'antibiotiques

Références

Ce projet est financé par : Bourse Ecole doctorale Aix Marseille Université

GARCIA LABAIG Chloé
Poster 5

MISE AU POINT D'UN MODELE DE BIOFILM MIXTE M. ABSCESSUS/P. AERUGINOSA POUR L'ETUDE DE NOUVEAUX COMPOSES ANTIBIOFILM DANS LE CONTEXTE DE LA MUCOVISCIDOSE

Chloé GARCIA LABAIG (1,2), Hedia MARRAKCHI (1)

Fatima EL GARAH (2)

(1) Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), CNRS UMR 5089, Toulouse, France

(2) Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

Objectifs

Ces dernières années, *Mycobacterium abscessus* (Mabs) est devenu un agent pathogène de premier plan chez les patients atteints de mucoviscidose (MCV), chez lesquels il cause des infections graves. De plus, Mabs est de plus en plus fréquemment co-isolé avec *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) dans les expectorats des patients. Ces deux pathogènes sont connus pour leurs multirésistances aux antibiotiques de première ligne, ainsi que pour leur capacité à former des biofilms résistants dans les poumons des patients MCV. L'association de ces deux pathogènes représente une menace sérieuse pour ces patients, soulignant la nécessité de disposer de nouvelles stratégies de traitement efficaces. Celles-ci impliquent la mise au point de modèles *in vitro* robustes, permettant d'explorer les interactions entre ces deux bactéries, leur réponse aux traitements et d'évaluer des approches innovantes pour lutter contre ces pathogènes résistants.

Cette étude vise à développer un modèle *in vitro* de biofilm mixte Mabs/Pa, en établissant des conditions permettant la co-culture des deux espèces sous forme de biofilm, tout en limitant leur croissance planctonique.

Matériels et méthodes

Pour cela, nous avons d'abord évalué la croissance planctonique de Pa et de Mabs dans différents milieux classiquement utilisés pour la culture des mycobactéries, à savoir le milieu 7H9, supplémenté avec différentes concentrations de glycérol et/ou de glucose, et le milieu BBM (Bouillon Biofilm Modifié) utilisé pour la culture en biofilm de Pa. D'autres paramètres, tels que le revêtement des microplaques, ont également été évalués. Les deux espèces ont été par la suite cultivées individuellement et en co-cultures, jusqu'à 72h en microplaques. Les biofilms ont été quantifiés par la méthode de marquage au cristal violet (CV) et par comptage des unités formant colonies (UFC) après remise en suspension des cellules adhérentes. Enfin, les biofilms obtenus ont également été observés par microscopie à fluorescence afin de comparer leur organisation et architecture entre les différents milieux évalués.

Résultats

L'optimisation des conditions de culture et des différents paramètres a permis d'identifier les conditions permettant l'adhésion, notamment des mycobactéries, en fond de puits, et la croissance de biofilms mono-espèces et mixtes. Pour atteindre cet objectif d'adhésion, plusieurs paramètres ont été optimisés avec notamment le choix du support de culture, le milieu de culture et les temps d'inoculations des pathogènes. Ainsi, le milieu 7H9, supplémenté en glycérol à 0,1% ou en glucose à 0,05% ont été sélectionnés suite à l'obtention de biofilm mono-espèce et mixte de Mabs et Pa. De plus, des 1ers essais prometteurs en milieu SCFM (Synthetic Cystic Fibrosis Medium), permettra de complexifier ce modèle afin de se rapprocher au mieux des conditions *in vivo*.

Discussion et conclusions

L'une des principales perspectives de ce travail est d'utiliser ce modèle *in vitro* de biofilm mixte d'une part pour caractériser les interactions mises en jeu entre Mabs et Pa, et d'autre part de l'utiliser pour réaliser un criblage de chimiothèques de composés antibiofilms, seuls et en combinaison avec des antibiotiques de première ligne, afin d'identifier de nouvelles stratégies de traitement pour les co-infections Pa/ Mabs dans le contexte de la mucoviscidose.

Références

HADJ BOUZID Amel Imene

Poster 6

ÉVALUATION PAR CT DES METHODES D'APPRENTISSAGE PROFOND HOLISTIQUES 2D ET 3D POUR LA SEGMENTATION VOLUMETRIQUE DES LESIONS DES VOIES RESPIRATOIRES ET VALIDATION LONGITUDINALE ET MULTICENTRIQUE AVEC/SANS TRAITEMENT MODULATEUR DE LA MUCOVISCIDOSE

Amel Imene Hadj Bouzid 1

Gael Dournes 2, Baudouin Denis de Senneville 3

Fabien Baldacci 4, Pascal Desbarats 4, Patrick Berger 1, Ilyes Benlala 2, Stephanie Bui 5, Antoine Hutt 6, Renan Liberge 7, Paul Habert 8, Jean-Yves Gaubert 8, Marie Baque-Juston 9, Baptiste Morel 10, Gilbert, Ferretti 11,

1 - Univ. Bordeaux, INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, CIC 1401, F-33600, Pessac, France.

2 - CHU Bordeaux, Service d'Imagerie Thoracique et Cardiovasculaire, Service des Maladies Respiratoires, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Paediatric Cystic Fibrosis Reference Center (CRCM), CIC 1401, F-33600, Pessac, France.

3 - Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, IMB, UMR 5251, F-33400 Talence, France

4 - Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, LaBRI, UMR 5800, F-33400 Talence, France

5 - CHU Bordeaux, Service d'Imagerie Thoracique et Cardiovasculaire, Service des Maladies Respiratoires, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Paediatric Cystic Fibrosis Reference Center (CRCM), CIC 1401, F-33600, Pessac, France.

6 - Department of Thoracic Imaging, Heart & Lung Institute, Lille, Cedex, France.

7 - Department of Radiology, CHU Nantes, F-44000, Nantes, France.

8 - Imaging Department, Hopital La Timone, APHM, Aix Marseille University, Marseille, France.

9 - Paediatric Radiology Department, Hôpitaux Pédiatriques de Nice CHU-Lenval, Nice, France.

10 - Pediatric Radiology Department, Clocheville Hospital, CHRU de Tours, Tours, France.

11 - Department of Radiology, Grenoble-Alpes University Hospital, 38000, Grenoble, France.

Objectifs

Cette étude poursuit un double objectif. Premièrement, elle vise à réaliser une analyse comparative approfondie des capacités de segmentation holistique des réseaux de neurones convolutifs (CNN) en formats 2D et 3D, en se concentrant spécifiquement sur les lésions de la mucoviscidose. Deuxièmement, elle cherche à valider cliniquement le score NOVAA-CT (NOrmalized Volume of Airway Abnormalities) dans un contexte longitudinal et multicentrique. L'étude évalue notamment la corrélation entre le NOVAA-CT et deux critères de jugement établis dans la mucoviscidose : le volume expiratoire forcé en 1 seconde (VEMS) et le score CT Bhalla. Elle examine également les modifications longitudinales du NOVAA-CT chez les patients atteints de mucoviscidose sous traitement par Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor (ETI) ou corticostéroïdes pour une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA).

Matériels et méthodes

L'étude combine deux approches méthodologiques complémentaires :

(1) - Architecture des modèles et développement :

Le modèle nnU-Net a été utilisé comme architecture de base, avec des variantes 2D et 3D. L'encodeur comprend plusieurs blocs de traitement successifs intégrant une couche convolutive, un dropout, une normalisation d'instance et une activation Leaky ReLU. Le décodeur est structuré en deux sections : une première section de déconvolution avec une couche convolutive unique, et une seconde section de localisation des caractéristiques combinant couche convolutive, normalisation d'instance et activation Leaky ReLU.

Les spécifications techniques diffèrent entre les versions 2D (noyaux 3×3, stride 2×2) et 3D (noyaux 3×3×3, stride 2×2×2). Le taux d'apprentissage initial est fixé à 10^{-2} avec une mise à jour tous les 30 epochs. L'optimisation utilise un SGD avec momentum Nesterov de 0,99. Les tailles de patches sont de 512×512 en 2D et 96×160×160 en 3D, avec des tailles de lots respectives de 12 et 2.

(2) Validation clinique et données :

La validation clinique a été menée sur trois cohortes indépendantes totalisant 139 patients atteints de mucoviscidose entre 2010 et 2023 :

-Une cohorte ETI de 60 patients traités par Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor

-Une cohorte ABPA de 20 patients traités par corticostéroïdes

-Une cohorte externe multicentrique de 59 patients provenant de six institutions distinctes

Les scanners CT ont été réalisés sur quatre types de scanners multidetecteurs de deux grands fabricants, avec des épaisseurs de coupe comprises entre 0,625 et 1,25 mm. Les examens ont été standardisés lors des évaluations longitudinales.

Le NOVAA-CT quantifie cinq types de lésions : bronchectasies, épaissement péribronchique, mucus bronchique, mucus bronchiolaire et collapsus/consolidation. Le Volume Anormal Total (TAV) correspond à la somme des volumes des cinq types de lésions. Les volumes sont normalisés par rapport au volume pulmonaire total.

(3) Protocole d'évaluation :

L'évaluation s'est faite selon plusieurs axes :

* Pour la comparaison 2D/3D :

-Une fonction de perte personnalisée WDiceTop50 combinant coefficient Dice et focus sur les 50% pixels les plus difficiles

-Métriques d'évaluation : coefficient Dice, Distance de surface normalisée (NSD), sensibilité, spécificité et aire sous la courbe (AUC)

* Pour la validation clinique :

-Corrélations entre NOVAA-CT, score Bhalla et VEMS

-Évaluation longitudinale des modifications sous traitement

-Analyse de reproductibilité par coefficient de corrélation intraclasse

-Tests de corrélation de Spearman sans hypothèse de normalité

Résultats

(1) Comparaison des modèles 2D et 3D :

Les modèles 2D et 3D montrent une efficacité comparable pour la détection des bronchectasies (Dice ~80%) et l'épaississement péribronchique (Dice ~64%). Cependant, le modèle 3D se distingue par sa capacité supérieure à détecter les lésions de petite taille comme le mucus et les consolidations.

La fonction de perte personnalisée améliore significativement les performances du modèle 2D avec :

+6% Dice pour le mucus bronchique

+4% Dice pour le mucus bronchiolaire

+2% NSD pour les deux types

Le modèle 3D ne montre qu'une amélioration marginale de 1%.

(2) Validation clinique du NOVAA-CT :

Les corrélations avec le VEMS et le score Bhalla sont significatives dans les trois groupes indépendants :

Groupe ETI : $\rho=0,81$ ($p<0,001$) pour le VEMS

Groupe ABPA : $\rho=0,81$ ($p<0,001$) pour le VEMS

Groupe externe : $\rho=0,81$ ($p<0,001$) pour le VEMS

Dans le groupe ETI ($n=60$), après traitement :

Amélioration du VEMS médian de 82,5 à 103 ($p<0,001$)

Réduction du TAV médian de 67,3 à 7,6 ($p<0,001$)

Diminution significative de tous les types de lésions y compris les bronchectasies

Dans le groupe ABPA (n=20) :

Amélioration du VEMS médian de 82 à 83,5 (p=0,003)

Réduction du TAV médian de 146 à 34 (p<0,001)

Diminution significative de toutes les lésions sauf les bronchectasies

La reproductibilité est excellente avec un ICC>0,99 et un temps de traitement de 6-8 minutes par scanner.

Discussion et conclusions

(1) Discussion :

Cette étude apporte plusieurs contributions importantes. Premièrement, elle remet en question la supériorité présumée des modèles 2D en démontrant les avantages de l'approche 3D pour la segmentation des lésions complexes de la mucoviscidose, notamment grâce à une meilleure exploitation de l'information spatiale tridimensionnelle. Cette efficacité est particulièrement notable pour les lésions de petite taille de grades 1 et 2.

Le NOVAA-CT se distingue des méthodes de scoring visuel traditionnelles par sa capacité à fournir une évaluation quantitative précise et reproductible. Il permet notamment une caractérisation détaillée des profils d'anomalies structurales et une détection sensible des modifications sous traitement. La réversibilité des bronchectasies observée sous ETI chez les patients jeunes avec une maladie modérée plaide en faveur d'une intervention thérapeutique précoce.

L'étude présente certaines limitations, notamment son caractère rétrospectif et monocentrique pour l'évaluation des effets thérapeutiques. Des développements futurs pourraient inclure l'implémentation de segmentations lobaires ou segmentaires et l'adaptation à d'autres pathologies respiratoires.

(2) Conclusion :

Cette étude démontre la supériorité du modèle 3D pour la segmentation holistique des lésions de la mucoviscidose et valide le NOVAA-CT comme un outil quantitatif fiable et sensible pour le suivi de la maladie. La méthode permet une évaluation objective et reproductible des modifications structurales sous traitement, ouvrant la voie à son utilisation comme critère de jugement dans les essais thérapeutiques. La capacité à quantifier la réversibilité volumétrique des lésions bronchiques sous ETI représente une avancée particulièrement prometteuse pour le suivi thérapeutique personnalisé.

Références

DOI: 10.1109/ISBI56570.2024.10635201

DOI: 10.1007/s00330-024-11019-5

Ce projet est financé par : RRI IMPACT

IMPACT DES MODULATEURS DE CFTR SUR LE DIALOGUE ENTRE LE MICROBIOTE ET L'ÉPITHELIUM INTESTINAL

Hugo Mathé¹, Véronique Douard², Laurence Delhaes³, Raphaël Enaud³, Vinciane Saint-Criq¹

1. UMR1319 MICALIS, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Equipe ProbiHôte, Jouy-en-Josas

2. UMR1319 MICALIS, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Equipe Amipem, Jouy-en-Josas

3. Université de Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Inserm UMR1045, Bordeaux

Objectifs

La mucoviscidose est caractérisée par une augmentation de la viscosité des sécrétions et une inflammation des épithéliums, particulièrement aux niveaux pulmonaire et intestinal. Une récente étude révèle des changements de diversité et de composition du microbiote suite au traitement par la trithérapie elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI ou Kaftrio®). La biocollection Kaf-Biota est notamment constituée d'échantillons fécaux provenant de patients avant et à différents temps après l'initiation du traitement par ETI. Notre projet propose d'étudier le rôle des changements du microbiote induits par les modulateurs de CFTR dans la pathologie intestinale associée à la mucoviscidose, grâce à cette biocollection. Plus particulièrement, nous souhaitons étudier *in vitro* le potentiel pro- ou anti-inflammatoire des surnageant fécaux de patients avant ou après le début du traitement par ETI, ainsi que leurs effets sur la perméabilité épithéliale intestinale.

Matériels et méthodes

Différents métabolites produits par le microbiote seront quantifiés. Tout d'abord les acides gras à chaîne courte (AGCC) seront extraits et dosés par chromatographie en phase gazeuse et l'activité protéase sera mesurée par test colorimétrique basé sur la protéolyse de l'azocaséine. D'autre part, nous testerons *in vitro*, l'impact des surnageants de selles (avant ou après ETI) sur la perméabilité et la réponse inflammatoire d'un épithélium intestinal composé de cellules HT-29 et Caco-2 cultivées sur support semi perméable. La perméabilité sera évaluée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale alors que la réponse inflammatoire sera quantifiée en mesurant les niveaux d'ARNm et de protéine de cytokines par qPCR et ELISA respectivement.

Résultats

Notre projet débutera en janvier 2025 ; notre hypothèse primaire est que le microbiote intestinal des patients CF avant traitement au ETI participe à la perturbation de l'homéostasie de l'épithélium intestinal en modifiant les réponses inflammatoires, protéasiques et/ou oxydatives et que cet équilibre est partiellement ou complètement restauré par le traitement par ETI. Ainsi nous anticipons une augmentation des quantités d'AGCC et une diminution de l'activité protéase dans les échantillons de patients avec ETI. Nous nous attendons aussi à une moindre induction de l'inflammation après incubation des cellules épithéliales intestinales.

Discussion et conclusions

Les résultats notre projet établiront si (i) l'ETI induit un changement de production en AGCC et activité protéasique par le microbiote intestinal, (ii) les métabolites des microbiotes de patients CF sont pro-inflammatoires en dehors d'un défaut d'activité de CFTR et (iii) si le traitement par ETI impacte les voies pro- et anti-inflammatoires. Notre étude permettra d'accroître les connaissances de l'impact des modulateurs de CFTR sur la santé digestive. Ils pourront contribuer à définir des interventions nutritionnelles renforçant la barrière intestinale.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

MIENZANZAMBI Stecy
Poster 22

UN MODELE D'EPITHELIUM BRONCHIQUE DERIVE D'IPSC POUR ETUDIER LA MUTATION NON-SENS Y122X DANS LA MUCOVISCIDOSE

1,2. Stecy Mienanzambi, 1,2. B. Simonneau, 1,2,3. P. Fanen, 1,2. B. Duriez
1 IMRB – INSERM-U955, Créteil, France
2 Université Paris-Est Créteil, Créteil, France
3 Département de génétique médicale, AP-HP, CHU - H. Mondor, Créteil, Franc

Objectifs

Au sein d'un Consortium, nos objectifs sont (1) d'établir des cultures d'épithélium bronchique dérivé de cellules souches pluripotentes induites (iPSC), soit de type sauvage (WT), soit porteuses de la mutation non-sens Y122X cultivée à l'interface air-liquide (ALI) ; (2) tester de nouvelles molécules sélectionnées par les équipes du Consortium pour restaurer la production et la fonction de CFTR.

Matériels et méthodes

Différenciation des lignées iPSC PCI-CAU2, CFTR-WT et –Y122X en épithélium bronchique cultivé en ALI. Caractérisation de l'intégrité, de la structure et de la composition cellulaire de l'épithélium bronchique par mesure du paramètre de résistance électrique transépithéliale (TEER) et immunomarquage pour identifier les types de cellules épithéliales (cellules basales, cellules ciliées, cellules sécrétoires, cellules de club et ionocytes).

Résultats

Deux différenciations indépendantes de la lignée iPSC CFTR-WT en épithélium bronchique se sont déroulées efficacement à travers plusieurs étapes de différenciation. Après que plus de 80 % des iPSC aient été différenciées avec succès en cellules endoderms définitives (CKIT+/CXCR4+), elles ont été différenciées en progéniteurs pulmonaires (CD47^{high}/CD26^{low}). D'autres étapes permettent la différenciation en cellules basales induites (iBCs) (NGFR+/EpCAM+). Ces iBCs peuvent se différencier en types cellulaires principaux composant un épithélium bronchique pseudo-stratifié dans des conditions de culture ALI sur Transwell™.

Il est intéressant de noter que le TEER de l'épithélium bronchique dérivé de WT iPSC est comparable à celui d'un épithélium dérivé de cellules épithéliales nasales humaines primaires (HNEC), le modèle cellulaire le plus proche à ce jour des conditions physiologiques (n = 1). Des expériences de coloration par immunofluorescence sur la lignée WT iPSC ont révélé la présence de cellules basales (KRT5+), ciliées (acétyltubuline+), sécrétoires (MUC5AC+) et de club (SCGB1A1+). Les ionocytes doivent être identifiés car nous avons observé des cellules exprimant CFTR positives marginales. A l'aide des outils CRISPR/Cas-9 (édition du génome), notre équipe a généré la lignée iPSC CFTR-Y122X, qui est isogénique à l'iPSC PCI-CAU2 (CFTR-WT). Un clone de CFTR-Y122X iPSC a franchi avec succès les premières étapes critiques de différenciation. En effet, plus de 80 % des cellules se sont différenciées en cellules endoderms définitives. Ainsi, 16,04 % ont été différenciés en progéniteurs pulmonaires. Ces cellules sont actuellement cultivées dans un milieu basal medium avant d'être cultivé dans un système ALI pour former un épithélium bronchique. Ils seront ensuite caractérisés par des techniques d'immunomarquage et de fonction.

Discussion et conclusions

Nos résultats de marquage par immunofluorescence démontrent que la lignée iPSC PCI-CAU2 CFTR-WT peut se différencier en un épithélium bronchique pseudo-stratifié avec la présence de cellules spécifiques : cellules basales, ciliées, sécrétoires et clubs. La TEER de l'épithélium dérivé d'iPSC est comparable à celle de la culture HNEC. La différenciation vers l'épithélium bronchique de la lignée iPSC PCI-CAU2 CFTR-Y122X est toujours en cours. Dès que nous aurons un épithélium avec la mutation Y122X, nous identifierons les conséquences de cette mutation au niveau de l'ARNm et des protéines par comparaison avec les épithéliums de la lignée contrôle isogénique.

À terme, ces épithéliums seront utilisés pour tester le potentiel des modulateurs de CFTR nouvellement découverts par les équipes du Consortium et, combinés aux modulateurs existants, restaurant la production, le

trafic et l'activité de la mutation de CFTR_Y122X . Le gonflement induit par la forskoline constituera un test fonctionnel approprié pour évaluer l'efficacité de la combinaison des modulateurs.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Blanche pour Vaincre la Mucoviscidose

MILLET Nicolas
Poster 10

ROLE D'EPHA2 DANS LES INFECTIONS A ASPERGILLUS FUMIGATUS ET LE DEVELOPPEMENT DE L'ASPERGILLOSE BRONCHO-PULMONAIRE ALLERGIQUE ASSOCIEE A LA MUCOVISCIDOSE

Dr. Nicolas Millet, Jeanne Bigot¹, Eloi Poucet², Solène Dulac², Juliette Guitard¹, Christophe Hennequin¹, Loïc Guillot², Thierry Fontaine³, Viviane Balloy²

¹ Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), 75012 Paris, France.

² Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France.

³ Unité Biologie et Pathogénicité Fongiques, Institut Pasteur, Paris, France.

Objectifs

Ce travail vise à élucider le rôle du récepteur EphA2 dans la réponse des cellules épithéliales bronchiques (CEB) à l'infection par *Aspergillus fumigatus*, en mettant l'accent sur son implication dans la signalisation inflammatoire et la clairance fongique. Nous explorons également son potentiel en tant que cible thérapeutique dans le cadre de l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) associée à la mucoviscidose.

Matériels et méthodes

- In vitro : Analyse des voies de signalisation, de la production de cytokines et de l'invasion fongique des CEB issues de patients mucoviscidosiques (CF) et non CF. L'inhibition de l'EphA2 est réalisée par ARN interférence, et les phosphorylations des kinases sont étudiées par des tests Multiplex et Phospho-Kinase Array.
- In vivo : Modèles murins d'ABPA utilisant des souris sauvages (WT) et déficientes en EphA2 (EphA2^{-/-}). Le potentiel thérapeutique est évalué par l'administration d'un anticorps bloquant anti-EphA2.

Résultats

EphA2 est surexprimé dans les CEB infectées par *A. fumigatus* et régule les réponses inflammatoires via la phosphorylation de plusieurs kinases et la production de cytokines pro-inflammatoires. Chez les souris EphA2^{-/-}, une diminution significative de la charge fongique et des marqueurs inflammatoires a été observée. Le blocage d'EphA2 dans les modèles murins d'ABPA a réduit l'inflammation chronique et amélioré la clairance fongique.

Discussion et conclusions

Nos résultats révèlent qu'EphA2 joue un rôle central dans les interactions hôte-pathogène dans la mucoviscidose, en modulant les réponses inflammatoires et antifongiques. EphA2 représente une cible prometteuse pour des approches thérapeutiques visant à atténuer les conséquences pathologiques des infections fongiques et des inflammations associées à l'ABPA.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal

ROLE DES POLYAMINES DANS LA VIRULENCE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA AU COURS DE L'INFECTION PULMONAIRE CHRONIQUE CHEZ LES PATIENTS CF

Victor Mora (1), Abdoul-Razak TIDJANI (1), Oriane Moynes (1), Mireille ROBERT-GENTHON (2), Éric FAUDRY (2), Ina ATTREE (2), Sylvie ELSEN (2), Bertrand TOUSSAINT (3), Audrey LE GOUELLEC (1)

1. Université Grenoble Alpes, TIMC UMR CNRS 5525, Grenoble, France.

2. Université Grenoble Alpes, CEA, INSERM, CNRS, Pathogénèse bactérienne et réponses cellulaires (UMR 1036), Grenoble, France.

3. Département de biochimie, biologie moléculaire et toxicologie environnementale, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France.

Objectifs

Les polyamines (polyA) sont des métabolites polycationiques impliqués dans plusieurs processus cellulaires. Des travaux antérieurs de notre groupe ont démontré une corrélation entre l'augmentation de la production de polyA par *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) et l'instabilité de la fonction pulmonaire chez les patients atteints de fibrose kystique (FK). Cette corrélation a été identifiée par une analyse métabolomique comparative non ciblée réalisée sur des souches cliniques de Pa provenant des voies respiratoires de patients atteints de FK. Cette étude multi-omique vise à comprendre comment Pa module sa production de polyA chez les patients atteints de FK, comment cela affecte l'expression des facteurs de virulence, et si Pa contrôle ses phases de virulence en modulant la production de polyA au cours des infections chroniques.

Matériels et méthodes

Des analyses génomiques et transcriptomiques ont été réalisées pour élucider les mécanismes par lesquels la production de polyA est modulée dans Pa. Des mutants isogéniques de Pa ont été générés pour bloquer partiellement ou complètement les voies de production des polyA. Des tests de virulence ont été menés pour évaluer l'impact de différents niveaux de polyA sur la virulence de Pa, les niveaux de polyA étant quantifiés par chromatographie liquide et spectrométrie de masse à haute résolution (LC/HRMS).

Résultats

L'étude a permis d'identifier trente-huit gènes surexprimés dans les isolats à forte production de polyA, notamment des gènes associés au système de sécrétion de type 3 (T3SS) et à la motilité. Parmi ceux-ci, *speE2* et *speD2* ont été impliqués dans l'augmentation des niveaux de spermidine, soulignant le rôle des voies alternatives dans la biosynthèse des polyA. Les polyamines synthétisées par ces voies alternatives ont contribué de manière significative à la cytotoxicité.

Discussion et conclusions

Ces résultats soulignent le rôle crucial des voies alternatives de biosynthèse des polyA dans l'augmentation de la virulence de Pa au cours des infections chroniques de la FK. La surexpression de gènes spécifiques associés à la virulence suggère que Pa module sa pathogénicité en ajustant la production de polyA. Le ciblage de ces voies alternatives constitue une stratégie thérapeutique potentielle pour gérer les infections chroniques à Pa et améliorer la stabilité de la fonction pulmonaire chez les patients atteints de FK.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal

DE LA CFTR AU RESEAU DE SIGNALISATION : UNE APPROCHE DE BIOLOGIE DES SYSTEMES POUR ETUDIER LA MUCOVISCIDOSE

Matthieu Najm, Loredana Martignetti, Matthieu Cornet, Mairead Kelly-Aubert, Isabelle Sermet, Laurence Calzone, Véronique Stoven

1. Center for Computational Biology (CBIO), Mines Paris-PSL, 75006 Paris, France
2. Institut Curie, Université PSL, 75005 Paris, France
3. INSERM U900, 75005 Paris, France
4. Institut Necker Enfants Malades, INSERM U1151, 75015 Paris, France
5. Université Paris Cité, 75015 Paris, France
6. Centre de Référence Maladies Rares, Mucoviscidose et Maladies Apparentées, Hôpital Necker Enfants Malades AP-HP Centre Paris Cité, 75015 Paris, France

Objectifs

La mucoviscidose est une maladie monogénique causée par des mutations du gène codant la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), mais sa physiopathologie globale ne peut pas être expliquée uniquement par la perte de la fonction du canal chlorure CFTR. En effet, CFTR appartient à un réseau de protéines qui n'a pas encore été entièrement déchiffré et qui participe à diverses voies de signalisation. Nous proposons une approche de biologie des systèmes pour étudier comment l'absence de la protéine CFTR à la membrane conduit à une perturbation de ces voies, résultant en un panel de phénotypes cellulaires délétères de la mucoviscidose.

Matériels et méthodes

Sur la base d'ensembles de données transcriptomiques accessibles au public, nous avons construit et analysé un réseau qui récapitule les dérégulations de la signalisation.

Résultats

La topologie du réseau et le phénotype qui en résulte se sont avérés cohérents avec la pathologie de la mucoviscidose. L'analyse de la topologie du réseau a mis en évidence quelques protéines susceptibles d'initier la propagation des dérégulations qui déclenchent les phénotypes cellulaires de la maladie, et a suggéré plusieurs cibles thérapeutiques candidates.

Discussion et conclusions

Bien que notre recherche soit axée sur la mucoviscidose, l'approche globale proposée dans cet article pourrait être également suivie pour étudier d'autres maladies rares monogéniques.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Blanche pour Vaincre la Mucoviscidose

LA LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA CONTRIBUE A LA TOLERANCE AUX ANTIBIOTIQUES DANS UN MODELE D'INFECTION PERSISTANTE CHEZ LE POISSON ZEBRE

Flore Nilly¹, Stéphane Pont¹, Laurence Berry¹, Anne Bonhoure¹, Patrick Plésiat² et Anne Blanc-Potard¹
¹ LPHI (Laboratory of Pathogen and Host Immunity), UMR CNRS 5294, Montpellier
² Chrono-environnement UMR 6249, CNRS, Université Bourgogne-Franche Comté, Besançon, France

Objectifs

La résistance aux antibiotiques cause des problèmes majeurs dans le traitement des infections bactériennes. Les infections bactériennes chroniques sont particulièrement difficiles à traiter du fait d'une résistance adaptative aux antibiotiques. Nous travaillons plus particulièrement sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, qui a une implication majeure dans la mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose qui sont chroniquement infectés. Il est donc crucial de disposer de modèles animaux adaptés au criblage de nouveaux traitements. Notre approche s'est orientée vers l'utilisation du poisson zèbre *Danio rerio*, qui est désormais établi comme un modèle vertébré pertinent pour la compréhension de la pathogénicité bactérienne. Nous avons récemment établi dans ce modèle une infection persistante à l'aide de souches cliniques isolées de patients atteints de mucoviscidose¹. Nous avons montré que les bactéries persistantes ne répondent plus à des antibiotiques utilisés en clinique tels que la tobramycine¹. Notre objectif est de comprendre pourquoi certains antibiotiques perdent leur efficacité et d'identifier des traitements antibiotiques efficaces contre les infections persistantes dans le modèle poisson zèbre.

Matériels et méthodes

En utilisant une nouvelle méthode d'infection, basée sur l'immersion d'embryons de poisson zèbre blessés au niveau de la queue, nous pouvons visualiser les bactéries persistantes en temps réel *in vivo* par microscopie confocale, possible du fait de la transparence des embryons. De plus, des observations à plus haute résolution sont également faites en microscopie électronique. Nous avons comparé l'efficacité d'antibiotiques connus pour pénétrer plus ou moins bien dans les cellules de l'hôte en quantifiant les CFUs dans les embryons infectés après traitement.

Résultats

Les bactéries persistantes sont capables de coloniser le site d'infection sous forme d'agrégats, dont certains localisés au sein des macrophages, pouvant y résider plusieurs heures. La microscopie électronique confirme une localisation intracellulaire, et même intra-vacuolaire, des bactéries. Cette persistance est associée à une diminution de la sensibilité à plusieurs antibiotiques classiquement utilisés en clinique contre *P. aeruginosa*. Un antibiotique, l'ofloxacine, connu pour pénétrer efficacement dans les cellules est apparu comme le plus efficace contre ces bactéries persistantes, suggérant que leur localisation intracellulaire contribue à limiter l'action des traitements *in vivo*. Une visualisation des bactéries après traitement ofloxacine soutient cette hypothèse.

Discussion et conclusions

Nous avons établi un modèle d'infection persistante à *P. aeruginosa* chez le poisson zèbre, imitant l'échec des traitements antibiotique retrouvé lors d'infections chroniques. Dans ce modèle, la persistance de *P. aeruginosa* est fréquemment associée à une localisation intracellulaire, qui contribue à limiter l'action des antibiotiques. Ainsi, les antibiotiques pénétrant mieux dans les cellules s'avèrent plus efficaces. Par la suite, il serait intéressant d'étudier la susceptibilité d'embryons *cftr* -/- à l'infection à *P. aeruginosa* dans un contexte de persistance.

Références

1. Pont, S. et al. Intracellular *Pseudomonas aeruginosa* persist and evade antibiotic treatment in a wound infection model. 2024.05.15.594279 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.05.15.594279> (2024).

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal

VIEILLIR AVEC LA MUCOVISCIDOSE : CARACTERISATION DE LA SENESCENCE DES CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES DES PATIENTS ET IMPACT DES NOUVELLES THERAPEUTIQUES CIBLANT CFTR

MéliSSa Papillon¹, Claire CALMEL¹, Arani MURALI², Saria FAKHRY¹, Romain MORICHON³, Harriet CORVOL¹, Bruno FEVE², Loïc GUILLOT¹, Carine BEAUPERE^{*2}, Manon RUFFIN^{*1}

1. Inserm, CRSA, Equipe Guillot/Corvol
2. Inserm, CRSA, Equipe Fève

Objectifs

La mucoviscidose (CF) est une maladie génétique rare dont l'insuffisance respiratoire est la principale cause de mortalité. Autrefois considérée comme une maladie pédiatrique en raison de la faible espérance de vie des patients, l'amélioration de la prise en charge et l'arrivée des « modulateurs de CFTR » a considérablement amélioré la fonction respiratoire des patients éligibles, prolongeant ainsi leur espérance de vie à près de 50 ans. Ainsi, la population CF vieillit, ce qui entraîne de nouveaux défis de prise en charge liés à l'apparition de comorbidités liées à l'âge. Des données récentes ont révélé une accumulation de cellules sénescents dans le tissu pulmonaire de patients CF par rapport à des sujets sains, ainsi que l'apparition précoce de maladies liées à l'âge (cancer, ostéoporose, diabète...), suggérant un vieillissement prématuré des patients CF. Il apparaît donc crucial d'étudier l'impact des mutations de CFTR et des modulateurs de CFTR sur la sénescence cellulaire et le vieillissement, ainsi que les mécanismes et acteurs mis en jeu. Notre objectif est de mieux caractériser le phénotype sénescents des cellules épithéliales des voies aériennes CF et d'évaluer l'impact des modulateurs de CFTR sur la sénescence.

Matériels et méthodes

Nous avons utilisé différents modèles de cellules épithéliales bronchiques, notamment les lignées immortalisées 16HBE (WT ou possédant différentes mutations de CFTR) ainsi que des cellules épithéliales bronchiques primaires différenciées issues de sujets non-CF (jeunes ou âgé) et de patients CF jeunes porteurs de la mutation F508del, cultivées à l'interface air-liquide. Ces cellules ont été traitées ou non pendant 7 jours avec le Kaftrio, une combinaison de 3 modulateurs de CFTR utilisée en clinique pour les patients porteurs de la mutation F508del, la plus fréquente. Différents marqueurs de sénescence ont été analysés. Nous avons quantifié l'expression en ARNm et protéine de p16, p21, de la lamine B1 (LMNB1), de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires associées à la sénescence, évalué les dommages à l'ADN par marquage en immunofluorescence du variant d'histone gH2A.X et enfin mesuré la dysfonction lysosomale en étudiant l'activité de la SA-β-Galactosidase (senescence-associated beta galactosidase). Nous avons également analysé l'expression de différents marqueurs de sénescence dans des données de transcriptomes réalisés précédemment au laboratoire à partir de cellules épithéliales différenciées et cultivées à l'interface air-liquide.

Résultats

Nos résultats préliminaires suggèrent que les lignées cellulaires 16HBE présentent un phénotype sénescents similaire, tandis que les cellules bronchiques primaires différenciées issues de patients CF mais également le patient non-CF âgé présentent une augmentation des marqueurs de sénescence par rapport à celles de sujets sains et jeunes. Ces résultats n'ont pas été confirmés dans les cellules 16HBE probablement du fait de leur immortalisation. Les données de transcriptomique montrent une augmentation des marqueurs de sénescence dans les cellules issues de sujets CF par rapport à celles issues de sujets sains. De plus, un traitement avec le Kaftrio a montré une tendance à la réduction de certains de ces marqueurs dans les cellules CF en culture primaire.

Discussion et conclusions

Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une sénescence prématurée chez les patients CF, bien qu'ils nécessitent confirmation sur un plus grand échantillon. Par ailleurs, les modulateurs de CFTR semblent atténuer cette sénescence dans les cellules traitées. Etant donné que les patients CF seront traités pendant de longues périodes avec les modulateurs de CFTR (traitement quotidien et à vie), il apparaît nécessaire d'étudier leurs effets à plus

long terme sur la sénescence. Enfin, nous envisageons désormais d'explorer les mécanismes sous-jacents à la sénescence prématurée des cellules épithéliales des voies aériennes chez les patients CF et les répercussions sur les cellules environnantes.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose

ROCHARD Camille
Poster 21

ETUDE DE L'EFFET ANTIFONGIQUE DE ETD151 UN PEPTIDE ANTIMICROBIEN SUR ASPERGILLUS FUMIGATUS

C. ROCHARD¹, J. BIGOT^{1,2}, V. BALLOY¹, C. HENNEQUIN^{1,2}, J. GUITARD^{1,2}
1 Sorbonne Université, Inserm U938, Centre de Recherche Saint-Antoine, 75012 Paris, France
2 AP-HP, Inserm, Hôpital Saint-Antoine, Service de Parasitologie-Mycoologie

Objectifs

Aspergillus fumigatus (Af) est l'espèce fongique prédominante à l'origine d'aspergilloses pulmonaires. Les aspergilloses pulmonaires chroniques surviennent chez des patients ayant une pathologie pulmonaire sous-jacente (mucoviscidose...) et sont associées à une réduction des performances respiratoires ainsi qu'à une mortalité élevée en l'absence de traitement. L'arsenal anti-aspergillaire est limité avec des molécules présentant des effets secondaires sévères ou des interactions médicamenteuses importantes. Par ailleurs, l'émergence récente de souches d'Af résistantes aux azolés est préoccupante. Dans ce contexte, les peptides antimicrobiens (PAM) apparaissent comme une approche thérapeutique prometteuse et une alternative aux antifongiques (ATF) conventionnels.

ETD151, un PAM, analogue d'une héliomicine de lépidoptère, a montré une activité ATF vis-à-vis du phytopathogène *Botrytis cinerea*, un champignon filamenteux comme Af. ETD151 cible les glucosylcéramides (GlcCer) de sa membrane puis est internalisé. Notre objectif principal est de déterminer l'activité ATF de ETD151 vis-à-vis de souches cliniques d'Af sensibles et résistantes aux azolés et d'évaluer son effet sur les cellules épithéliales bronchiques primaires humaines (CEBPH).

Matériels et méthodes

L'impact de ETD151 sur la morphologie et sur le métabolisme des souches d'Af a été mesuré, respectivement, par microscopie et par un test de mesure de l'activité métabolique à la résazurine. L'activité de perméabilisation de ETD151 a été confirmée par coloration du champignon avec un intercalant de l'ADN (SytoxGreen). De plus, l'effet fongicide du peptide a été évalué en administrant des doses répétées de ETD151 sur Af. Un test de développement de résistance a été réalisé en repiquant successivement Af en présence de ETD151. L'hypothèse de l'implication des GlcCer comme cible de ETD151 a été testée par des tests de compétition (étude de la morphologie et du métabolisme) avec des GlcCer et confirmée à l'aide d'une souche mutante d'Af délétée pour les GlcCer. L'activité ATF de ETD151 en présence de CEBPH a été confirmée par dénombrement de colonies et des études en microscopie confocale.

Résultats

ETD151 induit des altérations morphologiques majeures (raccourcissement et hyper-ramification) des filaments aspergillaires que les souches d'Af soient sensibles ou résistants aux azolés. La croissance des hyphes et l'activité métabolique d'Af sont également réduites significativement par le traitement par ETD151 pendant 15h, dès 1,25 μ M. Un traitement répété par 4 doses successives de 0,03 μ M de ETD151 permet d'abolir totalement la croissance de toutes les souches d'Af testées. Des études de compétition avec des GlcCer suggèrent fortement leur rôle dans l'activité de ETD151 sur Af. La souche mutante délétée pour les GlcCer nous a permis de confirmer cette hypothèse. Nous avons de plus confirmé l'action ATF de ETD151 sur Af en présence de CEBPH.

Discussion et conclusions

Nous allons compléter cette étude en évaluant l'effet de ETD151 sur Af en présence de CEBPH de patients atteints de mucoviscidose ou de BPCO. De plus, une utilisation de ce peptide couplé à un fluorophore est prévue afin de déterminer le lieu de fixation du peptide sur Af et une éventuelle internalisation de ETD151. Ainsi, nous espérons pouvoir confirmer l'intérêt de ETD151, dans la prise en charge des pathologies aspergillaires chroniques.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal

ROUSSET Aurélia
Poster 11

ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION IN VIVO DE P. AERUGINOSA ET DE SES INTERACTIONS AVEC S. AUREUS

Aurélia Rousset¹ (aurelia.rousset@univ-lyon1.fr), Sylvère Bastien¹, Laura Camus¹, Sara Moussadeq¹, François Vandenesch^{1, 2}, Anne Doléans-Jordheim^{1, 2}, Hélène Marchandin³, Karen Moreau¹
¹CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, Lyon, France.
Institut des agents infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.
²Centre National de Référence des Staphylocoques, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
³HydroScience Montpellier- Equipe Physe, Montpellier, France

Objectifs

20-30% des patients atteints de mucoviscidose sont co-infectés par *S. aureus* (SA) et *P. aeruginosa* (PA). Nous avons déjà montré que ces deux pathogènes peuvent avoir une relation compétitive ou coexistante et plusieurs études suggèrent que l'interaction entre ces deux pathogènes évolue au cours de la maladie. La capacité d'adaptation du PA et sa grande diversité génétique semblent être les facteurs majeurs de cette évolution. Cependant, la compréhension de la transition entre les deux niveaux d'interaction in vivo reste à démontrer, et les facteurs impliqués dans cette évolution restent à définir.

Matériels et méthodes

Pour répondre à ces questions, nous disposons d'une collection longitudinale de 5 ans de souches provenant d'un seul patient atteint de mucoviscidose, avec 46 isolats de PA et 44 isolats de SA. Pour démontrer l'évolution in vivo des interactions entre PA et SA, nous avons réalisé des tests de compétition. Pour déterminer les facteurs bactériens impliqués dans ce processus évolutif, nous avons analysé divers caractères phénotypiques tels que la cinétique de croissance, la formation de biofilm et les tests de motilité, et nous avons également utilisé divers outils d'analyse omique : génomique et transcriptomique.

Résultats

Nous avons pu montrer que les isolats de PA appartenaient à un seul clone, alors que les isolats de SA appartenaient à deux clones étroitement liés. Le test de compétition a été utilisé pour démontrer pour la première fois l'évolution in vivo d'une souche compétitive de PA vers une souche capable de coexister avec SA. Dans le même temps, nous avons observé une évolution phénotypique chez les isolats de PA, avec une diminution de l'aptitude, de la virulence et de la motilité et une augmentation parallèle du caractère mucoïde.

Discussion et conclusions

Ces changements phénotypiques sont corrélés à une différence d'expression génique révélée par l'analyse transcriptomique. En comparant les isolats concurrents de PA aux isolats coexistants, nous recherchons actuellement les marqueurs génétiques ou transcriptomiques responsables de cette coexistence bactérienne.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal

CARACTERISATION PRECLINIQUE D'UNE SOUCHE VACCINALE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN VITRO ET IN VIVO CHEZ LA SOURIS

Youssouf Sereme¹, Bérengère Villeret¹, Romé Voulhoux², Jean-Michel Sallenave¹

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1152, Physiopathologie et Épidémiologie des Maladies Respiratoires, Université Paris-Cité, Paris, France

2. Laboratoire de Chimie Bactérienne LCB-UMR7283, CNRS, Aix Marseille Université, IMM, Marseille, France.

Objectifs

Pseudomonas aeruginosa (PA) est l'un des principaux agents pathogènes responsables de pneumonies nosocomiales, d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose ou souffrant de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Il s'agit d'un pathogène opportuniste, appartenant au groupe des pathogènes ESKAPE multirésistants (MDR), et l'OMS considère PA comme une priorité pour le développement de nouveaux traitements ou de vaccins (non disponible actuellement). Nous avons précédemment identifié le gène *lasB* comme un facteur de virulence clé pour PA (1-2) et démontré qu'il est régulé négativement lorsque les souches PA sont cultivées dans un milieu appelé ici 'X'. Vu le caractère atténué de cette souche PA Δ *lasB* cultivée en 'X', nous émettons ici l'hypothèse qu'elle pourrait être utilisée comme souche vaccinale pour prévenir les infections chroniques à PA chez les patients atteints de la mucoviscidose.

Matériels et méthodes

Nous avons caractérisé la souche vaccinale Δ *lasB* cultivée en 'X' au niveau génomique (WGS) et transcriptomique (RNA-seq) en la comparant avec les souches PA WT et Δ *lasB* cultivée en milieu LB. Puis, l'innocuité de la souche candidate vaccin a été comparée aux 2 autres souches via l'évaluation de : (1) la motilité, la production de pyocyanine et l'auxotrophie (dans un milieu minimal), (2) la virulence in vitro via la mesure de toxicité et de l'attachement sur des cellules murines épithéliales pulmonaires (DJS-2, CMT), sur des macrophages alvéolaires (MAs, MPI) et sur des cellules dendritiques murines (DC2.4 et MUTUs, respectivement cDC2- et cDC1- like). Enfin, (3) la production de cytokines inflammatoires (TNF, IL-6, IL-1beta, IL-23...) post-infection de ces cellules et (4), la virulence in vivo des trois souches a été étudiée.

Résultats

Nous avons observé une baisse de motilité et de production de pyocyanine ($p=0,02$) ainsi qu'une auxotrophie chez la souche candidate vaccine Δ *lasB* cultivée en 'X'. In vitro, nous avons également observé une plus grande adhésion des souches WT et Δ *lasB* sur les macrophages MPI, les cellules épithéliales DJS-2 et sur les cellules dendritiques MUTUs et DC2.4 ($p=0,02$) alors que la souche vaccinale Δ *lasB* cultivée en 'X' adhère moins et induit plus de production de cytokines TNF par les macrophages ($p=0,02$) et significativement moins de cytotoxicité sur les quatre lignées cellulaires ($p=0,004$). Enfin in vivo, après une infection pulmonaire avec 5×10^8 CFU/souris, 100% et 60% de mortalité a été observée avec les souches Δ *lasB* cultivée en milieu LB et Δ *lasB* cultivée en 'X', respectivement.

Discussion et conclusions

Nos résultats montrent bien une atténuation de la souche vaccinale Δ *lasB* cultivée en 'X'. Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-tendant de cette atténuation sont actuellement à l'étude au laboratoire in vitro et in vivo.

Références

- 1) Bastaert F, Kheir S, Saint-Criq V, Villeret B, Dang PM, El-Benna J, Sirard JC, Voulhoux R, Sallenave JM. *Front Immunol.* 2018;9:1675.
- 2) Saint-Criq V, Villeret B, Bastaert F, Kheir S, Hatton A, Cazes A, Xing Z, Sermet-Gaudelus I, GarciaVerdugo I, Edelman A, Sallenave JM. *Thorax.* 2018;73:49-61.

Ce projet est financé par : *Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal*

SIMONNEAU Benjamin

Poster 26

UTILISATION DE L'OUTIL CRISPR/CAS9 POUR LA CONSTRUCTION DE LIGNÉES iPSC PORTEUSES DE MUTATIONS DE CLASSE I ET V DE CFTR

B. Simonneau^{1,2}, M. Cailleret³, S. Baghdoyan³, S. Mienanzambie^{1,2}, B. Duriez^{1,2}, P. Fanen^{1,2}

1. INSERM, U955, IMRB, Créteil, France.
2. Université Paris-Est, Créteil, France.
3. I-stem, UMR861-CECS, Corbeil-Essones, France

Objectifs

En France, près de 80% des patients mucoviscidose porteurs de la mutation F508del sont éligibles à la trithérapie Kaftrio®. En revanche, environ 20% des autres patients se retrouvent dans une impasse thérapeutique. Les mutations de classe I conduisent à une absence d'expression de la protéine CFTR, liée à la présence de codon-STOP prématurés, alors que les mutations introniques de classe V conduisent à une perte d'abondance de CFTR lié à un défaut d'épissage et/ou l'instabilité des ARNm (1). L'association Vaincre la Mucoviscidose a mis en place le dispositif Di-T-CAP, permettant à cinq équipes françaises de se réunir dans le consortium ClassFirstTheraRead. Le but est de découvrir et de montrer l'efficacité de nouvelles molécules de translecture pour traiter les mutations codon-STOP, mais aussi de développer des Anti-Sens Oligonucleotide (ASO) stabilisateurs des ARNm de CFTR. Notre objectif au sein de ce consortium est de développer un modèle d'organoïdes d'épithélium bronchique pseudostratifié, à partir de la différenciation de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) porteuses des quatre mutations rares de CFTR.

Matériels et méthodes

- Culture de la lignée iPSC Pci-CAU2-CFTR WT
- Outils CRISPR/Cas9 : enzymes Cas9sp, Cas12a et Cas9sau, SgRNA ou CrRNA, single strand Oligo DeoxyriboNucleotide pour la recombinaison homologue (HDR)
- Logiciel CRISPOR TEFOR (design CRISPR), DEOCDR (analyse des bulks et clones)
- Électroporateur Neon™
- CellCelector™ pour le clonage
- Séquençage de Sanger pour validation des clones

Résultats

Pour la création de la lignée iPSC Pci-CAU2-CFTR Y122X (366 T>A, codon STOP TAA), l'enzyme Cas9sp a permis d'introduire la mutation Y122X, avec une efficacité de recombinaison de 34.3%. Le séquençage de 38 clones uniques a permis d'isoler 7 clones homozygotes pour la mutation Y122X. Pour la lignée Pci-CAU2-CFTR R553 (1657C>T, codon STOP TGA), l'enzyme SauCas9 (staphylococcus aureus) a conduit à une efficacité de recombinaison de 37,6%. Le séquençage de 61 clones a mené à l'obtention de 6 clones uniques homozygotes pour la mutation R553X.

Concernant la lignée Pci-CAU2-CFTR 1680-886A>G, le design CRISPR avec la Cas9sp a conduit à une efficacité de recombinaison de 61,9%. Le screening de 52 clones uniques a permis d'identifier 6 clones porteurs de la mutation CFTR 1680-886A>G. L'adaptation du design CRISPR a permis pour 3 clones de Pci-CAU2-CFTR 1680-886A>G, de conserver l'hétérozygotie du variant A/T présent dans la lignée d'origine en 1680-880. Enfin, pour la lignée Pci-CAU2-CFTR 1585-1G>A, l'enzyme Cas12a A.s. (acidaminococcus sp), a permis après séquençage de 168 clones, d'en obtenir 2 porteurs homozygotes de la mutation CFTR-1585-1G>A.

Discussion et conclusions

Nos résultats montrent la faisabilité expérimentale d'introduire les quatre mutations choisies au sein de notre consortium. La lignée Pci-CAU2-CFTR WT est donc la seule lignée contrôle isogénique à partir de laquelle les quatre lignées ont été construites. Cela permettant d'étudier uniquement l'impact de la mutation de CFTR sur son expression/activité. L'utilisation de différents outils CRISPR (Cas9sp, Cas9sau, Cas12a) a permis de designer

de façon spécifique des SgRNA/CrRNA proches des sites on-target, grâce à la diversité et à la spécificité des séquences PAM (Protospacer Adjacent Motif) propre à chaque enzyme Cas.

Les objectifs futurs sont d'évaluer l'absence de Off-targets CRISPR; De vérifier l'absence de remaniement chromosomique (Caryotype) ainsi que la bonne intégrité génomique (SNP-array) des lignées; de vérifier la conservation de la capacité de pluripotence des différents clones (trilineage). Enfin, la différenciation des quatre lignées iPSC en épithélium bronchique pseudostratifié et leurs cultures en interface air-liquide va permettre aux autres équipes du consortium, de tester les molécules de translecture/stabilisateurs d'ARNm qu'elles développent.

Références

(1) Lopes-Pacheco, 2020, PMID : 32153386

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Blanche pour Vaincre la Mucoviscidose

TARDIVY-CASEMAJOR Victor
Poster 15

DEVELOPPEMENT D'ANTICORPS MONOCLONAUX HUMAINS A VISEE THERAPEUTIQUE CIBLANT LES FACTEURS DE VIRULENCE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Victor Tardivy--Casemajor, Jean-Mathieu Desveaux¹, Eric Faudry¹, Carlos Contreras-Martel¹, François Cretin¹, Leonardo Sebastian Dergan-Dylon¹, Axelle Amen^{1,2}, Isabelle Bally¹, Fabien Chenavier¹, Delphine Fouquet³, Yvan Caspar^{1,4}, Ina Attrée¹, Andréa Dessen¹, Pascal Pognard^{1,5}

1 - Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, Institut de Biologie Structurale (IBS), F-38044 Grenoble, France

2 - Laboratoire d'Immunologie, CHU Grenoble Alpes, France

3 - Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires INSERM U1100 UFR de Médecine de Tours, 10 Bd Tonnelé, 37032 Tours Cedex

4 - Laboratoire de Bactériologie-Hygiène Hospitalière, CHU Grenoble Alpes, France

5 - Laboratoire de Virologie, CHU Grenoble Alpes, France

Objectifs

Les anticorps monoclonaux (Acm) sont de plus en plus utilisés en clinique pour traiter les cancers, les pathologies inflammatoires mais aussi les pathologies infectieuses, en particulier celles d'origine virale. Ils représentent une alternative prometteuse aux antibiotiques dans la lutte contre les bactéries multirésistantes.

Nous avons mis au point différentes stratégies pour isoler des Acm humains à visée thérapeutique ciblant des facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), une bactérie hautement résistante aux antibiotiques et infectant chroniquement les patients atteints de mucoviscidose. La colonisation par *P. aeruginosa* constitue notamment un facteur prédictif majeur de la sévérité de cette maladie. Dans un premier temps, nous avons choisi de cibler, comme facteur de virulence de *P. aeruginosa*, le système de sécrétion de type 3 (SST3) et ses composants PcrV, PscF et PopB/PopD.

Matériels et méthodes

Des donneurs d'une cohorte du CHU Grenoble Alpes de sujets atteints de mucoviscidose, ont été sélectionnés sur la base de leur titre en Ac sériques contre les cibles choisies, et sur la capacité de leur sérum à inhiber le SST3 de *P. aeruginosa* in vitro. Les cellules du sang périphérique des donneurs sélectionnés ont été prélevées avec le consentement éclairé de ceux-ci.

Afin d'isoler des Acm à partir de ces cellules, les lymphocytes B mémoire spécifiques sont identifiés en fonction de la capacité de l'Ac qu'ils portent à reconnaître les cibles choisies. Deux méthodes sont employées dans le laboratoire : soit un tri direct de cellules B spécifiques fixant l'antigène marqué, soit un tri agnostique suivi d'une activation par des cytokines et d'un criblage à haut débit des surnageants cellulaires. Les cellules B spécifiques identifiées sont ensuite lysées et les gènes des chaînes d'immunoglobulines amplifiés par PCR sur cellule unique, puis clonés. Les Acm recombinants sont produits par transfection de cellules HEK 293F. Ils sont caractérisés et évalués pour leur capacité à inhiber le SST3 de *P. aeruginosa*.

Résultats

Grace à la stratégie de tri direct, un panel d'Acm anti-PcrV et anti-PscF a été isolé et caractérisé. Parmi ceux-ci, deux Acm anti-PcrV ont montré une capacité d'inhibition du SST3. Nous avons résolu par cristallographie aux rayons X la structure d'un de ces deux Acm en complexe avec PcrV, révélant un épitope localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine.

Une étude fonctionnelle et structurale de cet Acm en comparaison avec d'autres Acm anti-PcrV inhibiteurs du SST3, précédemment décrits dans la littérature, a été réalisée. Les Acm ont été comparés pour leur fixation à PcrV sous sa forme monomérique et pentamérique, et évalués dans deux tests mesurant différents niveaux d'activité du SST3 : la formation du pore et l'injection de toxine. Nos résultats suggèrent des mécanismes d'action différents, allant de l'inhibition de la polymérisation de PcrV, à la perturbation de son rôle dans la formation du pore.

Par ailleurs, un criblage après activation agnostique de cellules B mémoire est en cours pour identification d'Acm anti-PopB/PopD capables d'inhiber le SST3. Les résultats seront obtenus prochainement et pourront être présentés au colloque.

Discussion et conclusions

Alors que le développement d'Acm pour la prévention et le traitement des maladies virales a considérablement progressé ces dernières années, les avancées dans le domaine des Acm ciblant les infections bactériennes restent limitées. Pour les virus, les cibles des Ac neutralisants sont généralement bien définies et consistent souvent en des protéines de liaison aux récepteurs exposées à la surface virale. Dans de nombreux cas, ces protéines ont été largement caractérisées sur le plan structurel dans leurs interactions avec les Acm, définissant ainsi des régions accessibles et conservées qui représentent des zones de vulnérabilité virale. Des études similaires, axées sur les aspects structuraux et mécanistiques, sont essentielles pour faire progresser le développement des Acm anti-bactériens ciblant les facteurs de virulence.

Nos résultats permettent ainsi de mieux comprendre la plus grande efficacité de certains Acm à inhiber le SST3 de *P. aeruginosa* en fonction de leur épitope et de leur mécanisme d'action potentiel. Ces données ouvrent la voie à des stratégies visant à isoler des Acm plus performants, et, potentiellement, pour la mise-au-point de nouveaux vaccins.

Références

Ce projet est financé par : Vaincre la Mucoviscidose, Association Grégory Lemarchal, ANR

WORKFLOW DU DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX MODELES D'ETUDE POUR EVALUER L'IMPACT D'UN DEFAUT DE FONCTION DE CFTR SUR LES OSTEOCYTES.

Léa Thoraval, Christine Guillaume, Laurine Hamon, Frédéric Velard
Université de Reims Champagne-Ardenne, UR BIOS, Reims

Objectifs

La maladie osseuse liée à la mucoviscidose (CFBD) a longtemps été considérée comme une complication de second plan du fait, notamment, de la courte espérance de vie des patients. Cette comorbidité est problématique pour la qualité de vie des patients, d'autant plus que les traitements existants restent peu efficaces [Jeffery, 2023]. La compréhension de l'impact du défaut de fonction du canal CFTR sur la physiologie osseuse est indispensable pour proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Des travaux antérieurs ont déjà pu montrer son effet sur l'activité des ostéoblastes [Velard 2014 ; Delion, 2016] et des ostéoclastes [Jourdain, 2021], laissant-pour-compte les ostéocytes qui sont pourtant les cellules majoritaires de l'os. Longtemps considérés comme un support passif, les ostéocytes se révèlent avoir de nombreuses fonctions de communication. Leur comportement anormal est décrit comme pouvant contribuer à la détérioration du tissu osseux dans l'ostéoporose post ménopause ou le vieillissement [Jilka, 2016]. Nous proposons ainsi de développer un modèle in vitro innovant pour étudier l'impact d'une dysfonction de CFTR sur les ostéocytes et ainsi mieux comprendre le déficit osseux des patients CF. Cette approche sera confrontée à une analyse ex vivo des ostéocytes dans les os de souris CF ou non, en situation d'ostéoporose induite et contrôle.

Matériels et méthodes

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) primaires humaines seront cultivées à la surface de biocéramiques macrotextrées durant 28 jours en DMEM, 10%SVF, 1%PS, 100nM dexaméthasone, 10mM β -glycérophosphate, 0,1 mg/mL acide ascorbique [Jugnet, 2017] avec ou sans l'ajout d'inhibiteurs pharmacologiques de CFTR. Après différenciation, l'expression de gènes ostéocytaires (BGLAP, SOST, DMP1, FGF23) sera évaluée par RT-qPCR ainsi que la sécrétion protéique associée par dosage ELISA. Des colorations (Von Kossa, Hématoxyline-Eosine) ainsi que des marquages fluorescents (COL1A1, Phalloïdine, DAPI) seront réalisés. Les échantillons seront analysés par microscopie à champ clair et confocale à résolution augmentée. Les tibias de souris CF (F508delCFTR) ou non seront collectés, fixés à l'éthanol, décalcifiés et préparés pour cryotomie et analyse confocale en résolution augmentée, ou transparisés pour analyse par microscopie à feuille de lumière. La quantification des ostéocytes et de leur réseau lacuno-canaliculaire sera évaluée.

Résultats

L'évaluation du profil d'expression génique permettra d'apprécier la différenciation ostéocytaire. Nous apporterons ainsi des éléments de réponse sur l'implication des ostéocytes dans la dérégulation de l'homéostasie osseuse chez les patients CF. A terme, nous travaillerons à partir de MSC dérivées d'iPSC générées depuis des fibroblastes de poumons de patients CF et de donneurs sains afin de tester l'impact de la mutation native de CFTR et la mettre en parallèle des observations de l'inhibition fonctionnelle pharmacologique du canal. Concernant les analyses ex vivo, nous avons déjà montré notre capacité à imager les ostéocytes et leurs prolongements par microscopie confocale. L'analyse microscopique permettra de comparer le phénotype des ostéocytes ou encore la densité des lacunes ostéocytaires, entre les conditions physiologique et pathologique. Les procédures d'ovariectomie permettant d'accéder à une ostéoporose induite par chute hormonale arrivant à leur terme, les premières comparaisons vont pouvoir être initiées.

Discussion et conclusions

N/A

Références

Ce projet est financé par :

25^{ème} Colloque français des Jeunes Chercheurs en mucoviscidose

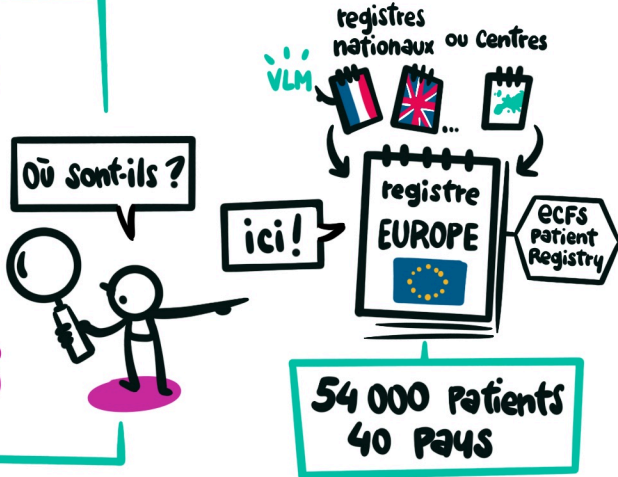


Que nous disent les **Registres** Européen et français 🇪🇺🇫🇷 sur l'état de santé des patients atteints de mucoviscidose ?

Pr **Isabelle FAJAC**

CRCM hôpital Cochin, APHP, Université Paris Cité
Présidente Société Européenne de Mucoviscidose (ECFS)

Maladies Rares = Peu de Patients



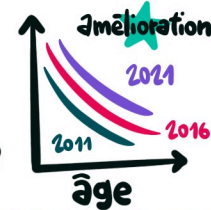
grand nombre d'adultes jeunes

entre 20-50 ans



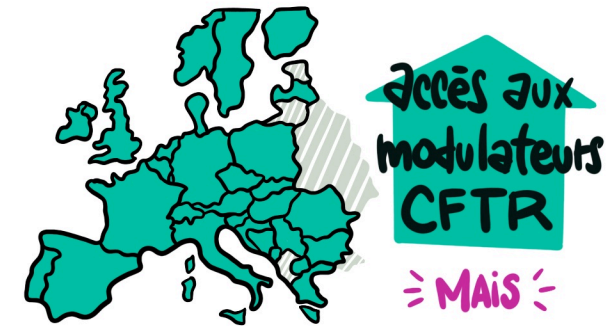
80% avec 1 F508del
éligibles aux traitements révolutionnaires!

évolution fonction respiratoire



depuis **Kaftrio** : réel gain

Transplantation



disparités de la santé patients selon PIB du PAYS

RÔLE FONDAMENTAL!



25^{ème} Colloque français des Jeunes Chercheurs en muco viscidose

SESSION

1

Le patient au cœur de toutes les recherches!



Johan Sergheraert

Comorbidités → densité minérale ↓ / risque fracture ↑

Patient CF → **CFBD**

altération fonction & Phénotype des ostéoblastes CF

Quels effets? → Restauration fo CFTR par modulateurs

monocytes Circulants x2.3 → altération Phénotype +150%

expo. Prolongée (par ETi) → Restauration Partielle → taille -70%

Sarahdja Cornelie

lésions Pulmonaires → absence CFTR fonctionnel

BESOIN: thérapies + anti-inflammatoires

EFFICACES

Rôle du Calcium épithélial → modèle Zebrafish

Nouvelle Cible thérapeutique → Ca^{2+} canaux VDCC

Reéquilibrer la réponse calcique

Lou Taillandier

Ma Muco! enquête → EXPAPARM ACTION → Participative

Banque d'items → Spécificité "Personnalisés"

4 Problématiques

fidèles à mes attentes → bonne réactivité!

terrains d'étude ↔ équipe recherche

MT 180

Raphaëlle Ladune

CO Conception → MUCO BALAD → acceptabilité

Balance décisionnelle en activité physique

appli Sécurisée → suivi → facile → tous Profils

Angèle Boursier

extraction spermatozoïdes épидидymaires

MV 23.7%	taux échec	AO 8.2%
----------	------------	---------

activité résiduelle CFTR ↔ sans activité sans activité

bonne qualité x2

mêmes chances de succès! taux grossesses ou naissances vivants

altération spermatogénèse → existence ou Pas activité résiduelle CFTR



25^{ème} Colloque français des Jeunes Chercheurs en muco viscidose

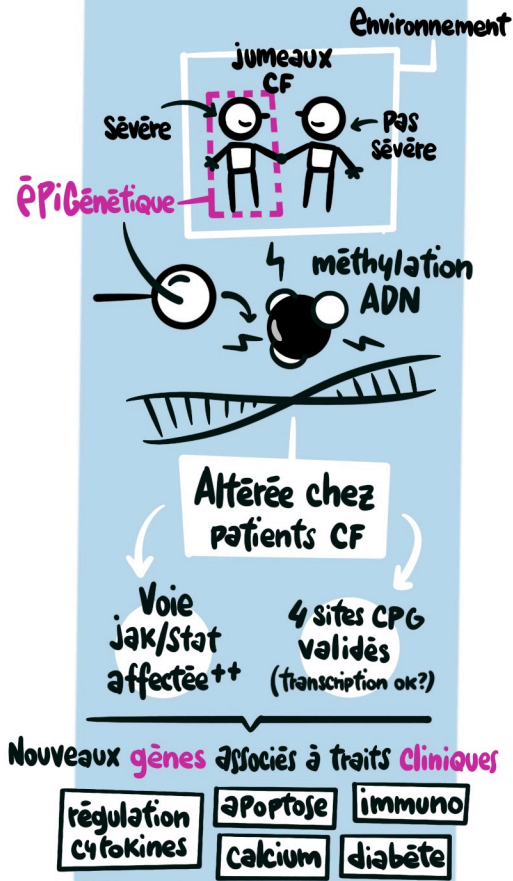
SESSION

2

Une histoire de canaux

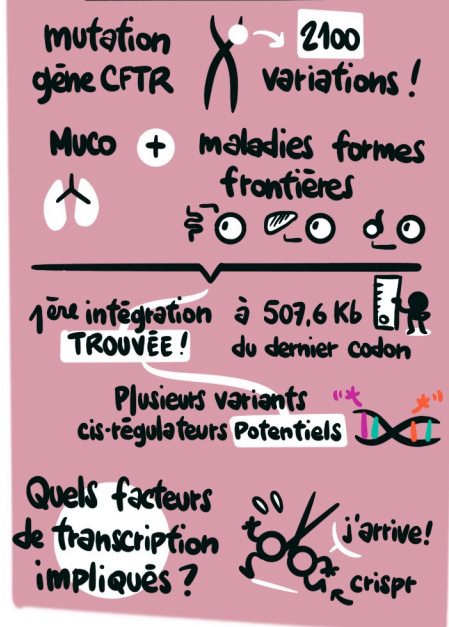


Lorëna Valdës

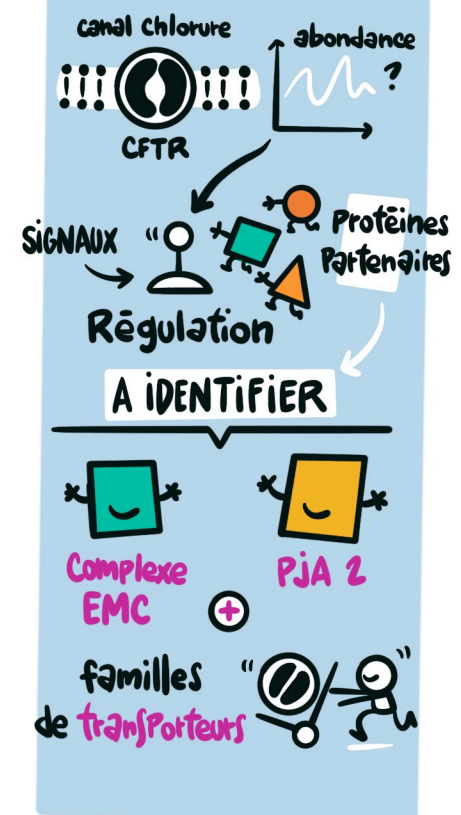


MT 180

Clara Blotas

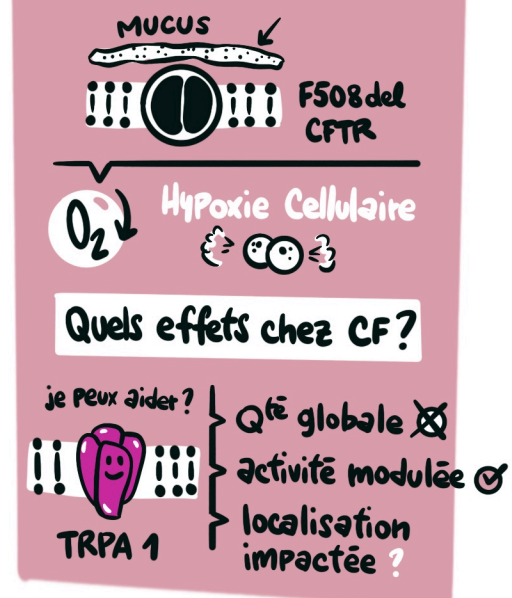


Solène Castanier



MT 180

Khilian Pascarel



Mardi 6 février 2024

institut imagine
GUÉRIR LES MALADIES GÉNÉTIQUES



#CFJC2024

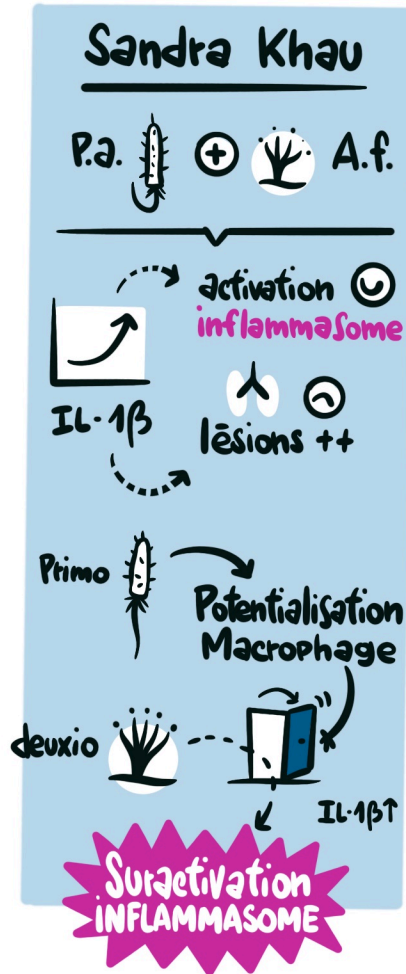
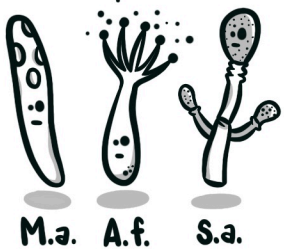


25^{ème} Colloque Français des Jeunes Chercheurs en Mucoviscidose

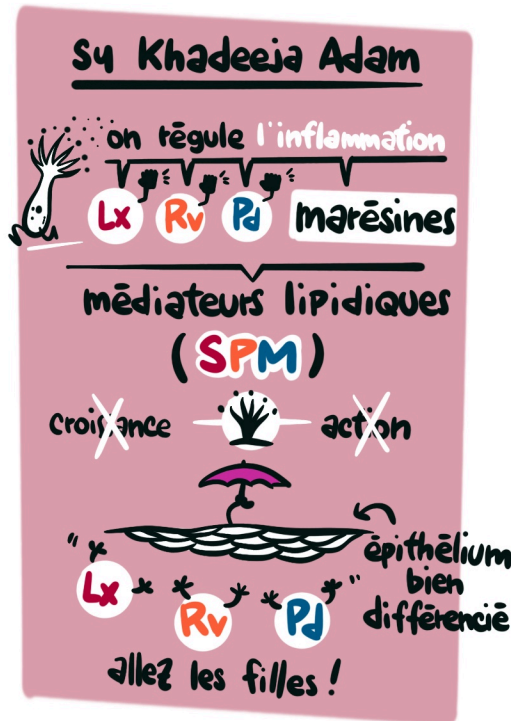
SESSION

4

Les autres microorganismes présents également!

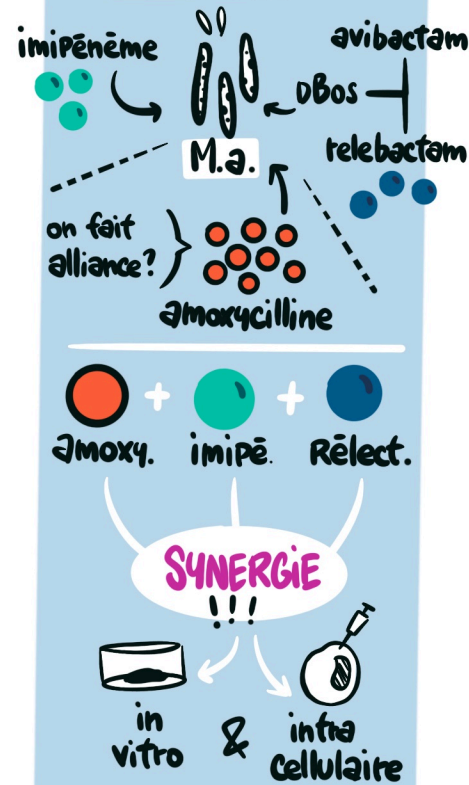


MT 180

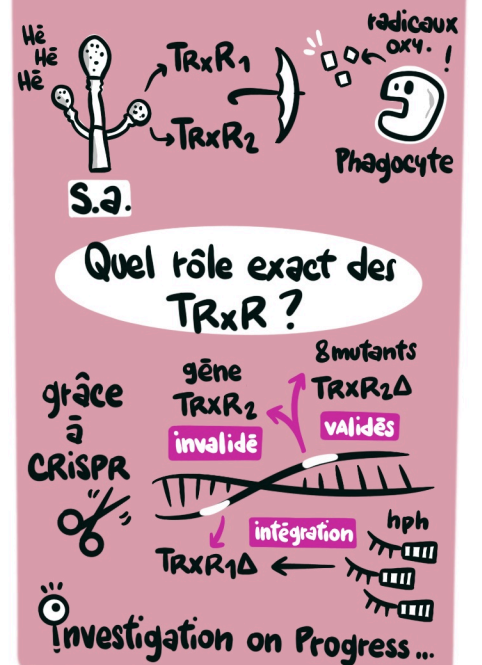


Maria Bitar

MT 180



Clarisse Carvalho



25^{ème} Colloque Français des Jeunes Chercheurs en MUCO VISCIDOSE

Angèle Boursier

extraction spermatozoïdes épидидymaires

MV 23.7% | AO 82.1%

taux échec

activité résiduelle CFTR vs sans activité

bonne qualité X2

mêmes chances de succès : taux grossesses ou naissances vivants

altération spermatogénèse

existence ou pas activité résiduelle CFTR

Sylvain Brax

cellule épithéliale

cytosquelette

SEPT 7

intégrité ++

bactéries

trouvé! chez ≈ 50% patients adultes

SEPT 7

contrôle de l'infection

P.a.

MUCO

Persistance de l'infection



POSTERS

Benjamin Simonneau

COMMOA

CiG-B-552

18

Chloë Felgerolle

T S B

PRÉ ARN_m

11

Flore Nilly

why? raté!

antibio

je suis 1 modèle de compréhension

biofilm

Zebra fish

P.a.

macrophage

on PAS y passer des heures! Si?...

diminution Sensibilité

classique

on peut rien faire?

si!

direct dans la cellule!

molécules anti-biofilm

MT 180

Khilian Pascarel

MUCUS

F508del CFTR

Hypoxie Cellulaire

O₂

Quels effets chez CF?

je PEUX aider?

TRPA 1

Qté globale X

activité modulée O

localisation impactée?

COUP DE

Angela Martin-Serrano Ortiz

15

P.a.



Remerciements :



Merci à tous
pour votre participation !

Organisation :

Vaincre la Mucoviscidose
Pôle Recherche
181, rue de Tolbiac – 75013 PARIS
recherche@vaincrelamuco.org

