

# 23<sup>ème</sup> édition du Colloque français des Jeunes Chercheurs en mucoviscidose

En visioconférence  
le 15 février 2022

Avec le soutien de nos  
partenaires



# Programme

## Colloque Français des Jeunes Chercheurs

### Mardi 15 février 2022

#### *En visioconférence*

9:15 - 9:30 **Accueil et mot de bienvenue** : Pierre Foucaud, Président de Vaincre la Mucoviscidose

9:30 - 10:00 **Conférence d'ouverture** par le Pr. Isabelle Durieu, responsable du CRCM adulte de Lyon (site constitutif) et animatrice de la Filière de santé maladies rares « Muco-CFTR » :  
« *Mucoviscidose à l'ère des thérapies modulatrices de CFTR : pistes de recherche à privilégier pour les patients* »

**Sessions de présentations orales**, modérées par :  
Madame Dominique Pougheon Bertrand et le Pr Jean-Christophe Pagès

10:00 - 11:15 **Session 1 : Thérapies ciblées et permissivité dans la lutte antibactérienne**

1. *ALCARAZ Matthéo : Efficacité et mode d'action d'un inhibiteur de la biosynthèse des acides mycoliques chez Mycobacterium abscessus.*
2. *LOUIS Mélissande : Le peptide natriurétique humain ANP comme arme anti-biofilm de Pseudomonas aeruginosa : effet et mécanisme d'action.*
3. *NOVELLI Marine : Criblage d'inhibiteurs des pompes d'efflux et pharmacomodulation pour améliorer l'efficacité des antibiotiques.*
4. *BORN-BONY Maëlys : Le transfert adoptif de MSDC module le rétablissement des souris après une infection pulmonaire à Pseudomonas aeruginosa.*
5. *SARRAZIN Morgane : Les Cyclipostines/Cyclophostines de nouvelles perspectives dans le traitement des infections à Mycobacterium abscessus chez les patients atteints de mucoviscidose.*

**Pause (15 min)**

11:30 - 12:30 **Session 2 : Dynamique de la colonisation bactérienne**

6. *HARDOUIN Pauline : Caractérisation du microbiote pulmonaire de patients atteints de la mucoviscidose par métabolomique.*
7. *TOURÉ Hamadoun : Mycobacterium abscessus résiste à la réponse cytotoxique innée de l'hôte infecté.*
8. *BASTIEN Sylvère : Evolution de Pseudomonas aeruginosa et de ses interactions avec Staphylococcus aureus chez les patients atteints de mucoviscidose.*
9. *PONT Stéphane : Pathogénicité de Pseudomonas aeruginosa et réponse immunitaire innée associée au cours d'une infection persistante dans un modèle d'embryon de poisson zèbre.*

12:30 - 13:45

**Pause déjeuner**

13:45 - 14:15 **Session 3 : Vivre avec la mucoviscidose**

10. FRENOD Cécile : *ExPaParM : une recherche collaborative pour définir des Patient-Reported Experience Measures (PREM).*
11. LOIZEAU Virginie : *Habiter avec la mucoviscidose : la contribution de l'analyse sociologique des pratiques d'hygiène domestique à la prévention des risques respiratoires.*

14:15 - 15:00 **Session 4 : La face cachée de l'inflammation**

12. BLEUSE Solenne : *Étude de la régulation de TTP, protéine anti-inflammatoire en contexte CF.*
13. BRIOTTET Maëlle : *Biosynthèse des médiateurs lipidiques de la résolution de l'inflammation dans la mucoviscidose et leurs effets sur la clairance mucociliaire.*
14. DELION Martial : *Profil inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques suite à la restauration de la fonction de CFTR : correcteurs versus expression génique.*

15:00 - 15:30 **Session 5 : Modèles d'étude**

15. DUMORTIER Claire : *Les iPSCs ; nouvelle source cellulaire pour l'étude du rôle de CFTR dans la maladie osseuse.*
16. MOTTAIS Angélique : *Modèle murin humanisé F508del : un nouveau modèle préclinique pour la mucoviscidose ?*

**Pause (15 min)**

15:45 - 16:45 **Session 6: Comprendre l'impact des traitements d'aujourd'hui et trouver ceux de demain**

17. SERGHERAERT Johan : *Evaluation de l'effet de traitements correcteurs et potentialisateurs de CFTR sur l'évolution de marqueurs liés à la pathologie osseuse liée à la mucoviscidose.*
18. LEPISSIER Agathe : *Mécanismes d'action impliqués dans la réponse respiratoire aux modulateurs de CFTR.*
19. MESINELE Julie : *Lumacaftor-ivacaftor : facteurs impliqués dans la réponse au traitement et impact sur la fonction respiratoire.*
20. MITRI Christie : *Développement d'une approche thérapeutique pour le traitement de l'ensemble des patients atteints de mucoviscidose.*

16:45 - 17:05 **Prix Michel Chignard 2022 : intervention de la lauréate et remise du prix**

17:05 - 17:15 **Annnonce des lauréats des prix du Colloque 2022**

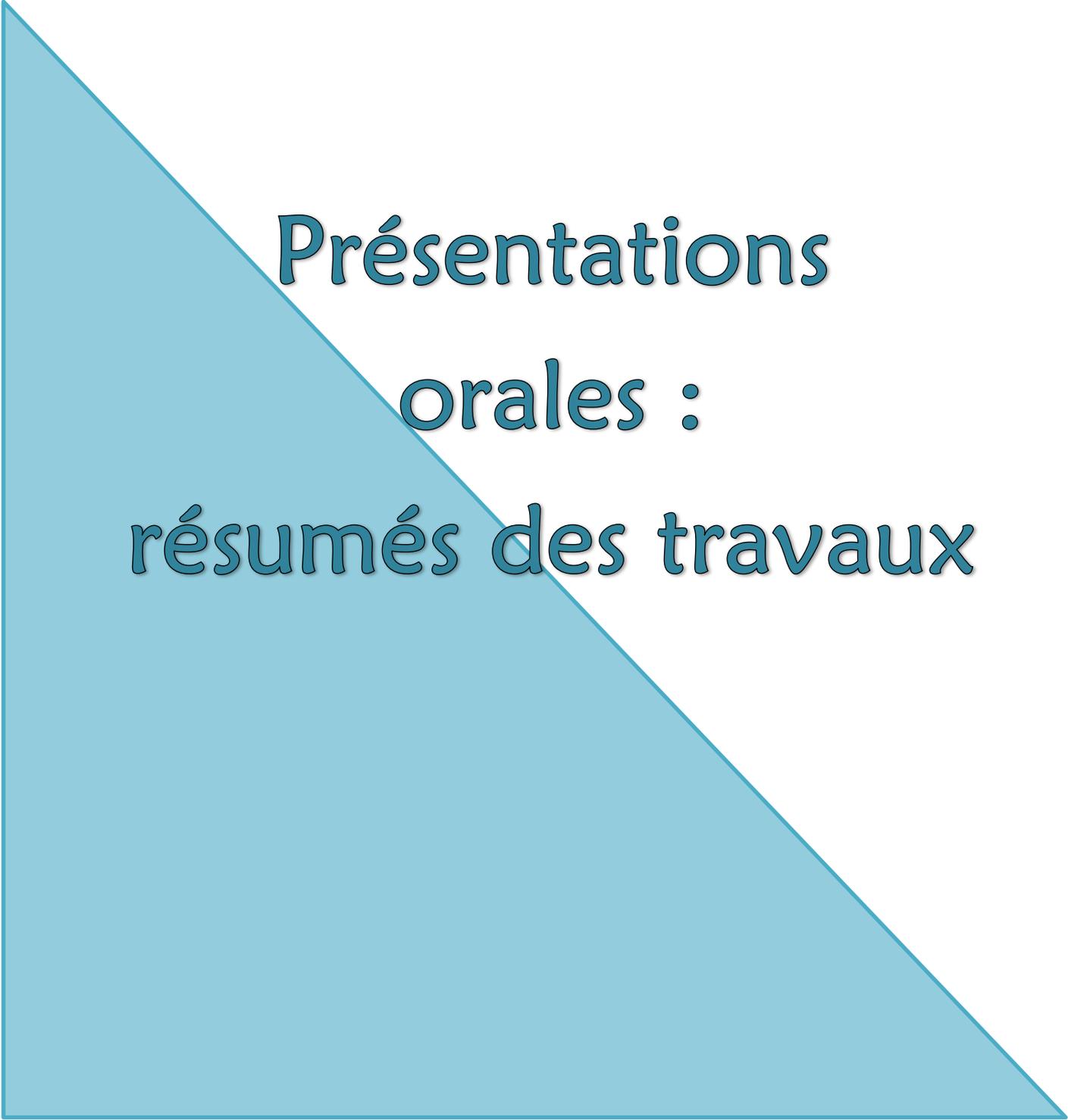
17:15 - 17:30 **Mot de clôture**



**Nous remercions nos partenaires pour le soutien de cette journée !**

## Contenu du book

|  |      |
|--|------|
| Présentations orales : résumés des travaux .....                   | p.1  |
| Résumés des travaux des autres jeunes chercheurs participants..... | p.23 |



Présentations  
orales :  
résumés des travaux

# Sommaire

| NOM                | Prénom     | TITRE   | page |
|--------------------|------------|---|------|
| <b>ALCARAZ</b>     | Matthéo    | <i>Efficacité et mode d'action d'un inhibiteur de la biosynthèse des acides mycoliques chez Mycobacterium abscessus</i>   | 3    |
| <b>LOUIS</b>       | Mélessande | <i>Le peptide natriurétique humain ANP comme arme anti-biofilm de Pseudomonas aeruginosa : effet et mécanisme d'action</i>  | 4    |
| <b>NOVELLI</b>     | Marine     | <i>Criblage d'inhibiteurs des pompes d'efflux et pharmacomodulation pour améliorer l'efficacité des antibiotiques</i>   | 5    |
| <b>BORN-BONY</b>   | Maëlys     | <i>Le transfert adoptif de MSDC module le rétablissement des souris après une infection pulmonaire à Pseudomonas aeruginosa</i>   | 6    |
| <b>SARRAZIN</b>    | Morgane    | <i>Les Cyclophostines/Cyclophostines de nouvelles perspectives dans le traitement des infections à Mycobacterium abscessus chez les patients atteints de mucoviscidose.</i> | 7    |
| <b>HARDOUIN</b>    | Pauline    | <i>Caractérisation du microbiote pulmonaire de patients atteints de la mucoviscidose par métaprotéomique</i>  | 8    |
| <b>TOURE</b>       | Hamadoun   | <i>Mycobacterium abscessus résiste à la réponse cytotoxique innée de l'hôte infecté</i>   | 9    |
| <b>BASTIEN</b>     | Sylvère    | <i>Evolution de Pseudomonas aeruginosa et de ses interactions avec Staphylococcus aureus chez les patients atteints de mucoviscidose</i>                                    | 10   |
| <b>PONT</b>        | Stéphane   | <i>Pathogénicité de Pseudomonas aeruginosa et réponse immunitaire innée associée au cours d'une infection persistante dans un modèle d'embryon de poisson zèbre</i>         | 11   |
| <b>FRENOD</b>      | Cécile     | <i>ExPaParM : une recherche collaborative pour définir des Patient-Reported Experience Measures (PREM)</i>  | 12   |
| <b>LOIZEAU</b>     | Virginie   | <i>Habiter avec la mucoviscidose : la contribution de l'analyse sociologique des pratiques d'hygiène domestique à la prévention des risques respiratoires</i>               | 13   |
| <b>BLEUSE</b>      | Solenne    | <i>Étude de la régulation de TTP, protéine anti-inflammatoire en contexte CF</i>  | 14   |
| <b>BRIOTTET</b>    | Maëlle     | <i>Biosynthèse des médiateurs lipidiques de la résolution de l'inflammation dans la mucoviscidose et leurs effets sur la clairance mucociliaire</i>                         | 15   |
| <b>DELION</b>      | Martial    | <i>Profil inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques suite à la restauration de la fonction de CFTR : correcteurs versus expression génique</i>                    | 16   |
| <b>DUMORTIER</b>   | Claire     | <i>Les iPSCs ; nouvelle source cellulaire pour l'étude du rôle de CFTR dans la maladie osseuse</i>  | 17   |
| <b>MOTTAIS</b>     | Angélique  | <i>Modèle murin humanisé F508del : un nouveau modèle préclinique pour la mucoviscidose ?</i>  | 18   |
| <b>SERGHARAERT</b> | Johan      | <i>Evaluation de l'effet de traitements correcteurs et potentialisateurs de CFTR sur l'évolution de marqueurs liés à la pathologie osseuse liée à la mucoviscidose</i>      | 19   |
| <b>LEPISSEIER</b>  | Agathe     | <i>Mécanismes d'action impliqués dans la réponse respiratoire aux modulateurs de CFTR.</i>  | 20   |
| <b>MESINELE</b>    | Julie      | <i>Lumacaftor-ivacaftor : facteurs impliqués dans la réponse au traitement et impact sur la fonction respiratoire</i>   | 21   |
| <b>MITRI</b>       | Christie   | <i>Développement d'une approche thérapeutique pour le traitement de l'ensemble des patients atteints de mucoviscidose</i>   | 22   |

**ALCARAZ Matthéo**

## **EFFICACITE ET MODE D'ACTION D'UN INHIBITEUR DE LA BIOSYNTHESE DES ACIDES MYCOLIQUES CHEZ MYCOBACTERIUM ABSCESSUS**

Matthéo ALCARAZ, Françoise Roquet-Banères<sup>1</sup>, Jan Abendroth<sup>2</sup>, Tom Edwards<sup>2</sup>, Laurent Kremer<sup>1</sup>

1. Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, CNRS UMR 9004, Université de Montpellier, Montpellier, France 2. Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease, Seattle, USA.

### **Objectifs**

*Mycobacterium abscessus* est un pathogène émergent et opportuniste pouvant causer des infections pulmonaires sévères, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose. Cette espèce bactérienne est particulièrement résistante à la plupart des antibiotiques, dont les anti-tuberculeux tel que l'isoniazide (INH) qui cible l'énoyl ACP réductase InhA, enzyme clé dans la biosynthèse des acides mycoliques. Dès lors, il apparaît nécessaire d'identifier de nouvelles entités chimiques et cibles thérapeutiques pour améliorer les traitements contre *M. abscessus*. Dans cette étude, nous décrivons l'activité et le mode d'action de la 4-hydroxy-2-pyridone NITD-916 (1) chez *M. abscessus*.

### **Matériels et méthodes**

L'activité *in vitro* de NITD-916 est déterminée par la mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) vis-à-vis d'un large panel d'isolats cliniques de *M. abscessus*. Des tests d'infection dans la lignée monocytaires THP-1 différenciée en macrophages ont été effectués afin d'évaluer l'activité du composé contre les formes bacillaires intracellulaires. Pour évaluer le mode d'action de ce composé, un radiomarquage métabolique a été effectué, suivi de l'analyse des lipides radiomarqués par chromatographie à couche mince. La sélection de mutants résistants spontanés à NITD-916 et le séquençage du gène *inhAMAB*, a permis de décrypter le mécanisme d'action de ce composé. La résolution de la structure cristallographique de *InhAMAB* complexée au NADH et au NITD-916 a été mise à profit pour confirmer le mécanisme d'inhibition de ce composé.

### **Résultats**

Les souches cliniques présentent une sensibilité élevée à NITD-916 avec une CMI de 1,56 µg/ml. Par ailleurs, NITD-916 est actif *in cellulo*, causant une réduction de la charge bactérienne intramacrophagique. Le composé réduit également le nombre ainsi que la taille des cordes intra- et extracellulaires, caractéristiques des variant rugueux de *M. abscessus* et impliquées dans la virulence. L'analyse lipidique des cultures traitées au NITD-916 indiquent que le composé inhibe la synthèse de novo des acides mycoliques. Des mutants hautement résistants au composé (CMI > 100 µg/ml) présentent une mutation dans le gène *inhAMAB* entraînant un changement d'acide aminé G96S ou G96V. La surexpression de ces allèles mutés entraîne une augmentation de la CMI, suggérant que la protéine *InhAMAB* est la cible de NITD-916 chez *M. abscessus*. Les études cristallographiques montrent un réseau d'interaction entre NITD-916 et le site actif de *InhAMAB* et que le remplacement de la Gly96 par un acide aminé plus volumineux provoque un encombrement stérique empêchant la fixation de l'inhibiteur dans le site actif de l'enzyme.

### **Discussion et conclusions**

Ces résultats indiquent que NITD-916 présente une forte activité contre les formes intra- et extracellulaires de *M. abscessus* en agissant comme un inhibiteur direct de la protéine *InhAMAB*, conduisant à l'arrêt de la synthèse des acides mycoliques. Ils ouvrent la voie à d'autres études destinées à améliorer l'activité et les propriétés pharmacologiques des 4-hydroxy-2-pyridones. Enfin, ils confortent l'idée que *InhAMAB* est une cible attractive à exploiter dans de futurs développements thérapeutiques.

### **Références**

(1) Manjunatha UH et al. Direct inhibitors of InhA are active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med*. 2015;7(269):269ra3-269ra3.

#### **FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## LOUIS Mélissande

### LE PEPTIDE NATRIURETIQUE HUMAIN ANP COMME ARME ANTI-BIOFILM DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA : EFFET ET MECANISME D'ACTION

1LOUIS Mélissande, 1Clamens Thomas, 1Desriac Florie, 1Rodrigues Sophie, 2Kipnis Eric, 2Grandjean Teddy, 1Bouffartigues Emeline, 1Cornelis Pierre, 1Chevalier Sylvie, 1Feuilloley Marc G.J., 1Tahrioui Ali and 1Lesouhaitier Olivier

1.Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement LMSM EA 4312, Université de Rouen Normandie, 27000 Evreux, France  
2.Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR9017-CIIL-Centre, d'Infection et d'Immunité de Lille, Université de Lille, F-59000, Lille, France

#### Objectifs

Dans la présente étude, nous avons évalué l'effet d'une hormone, le peptide natriurétique auriculaire (ANP) sur les biofilms de *P. aeruginosa*.

#### Matériels et méthodes

Essentiel des résultats a été obtenu par l'utilisation d'un système de formation de biofilm en conditions dynamiques. Les images de ces biofilms ont été réalisées avec un microscope confocal à balayage laser.

#### Résultats

Nous avons observé, dans un premier temps, que l'ANP inhibe également fortement la formation des biofilms de *P. aeruginosa*. Par ailleurs, contrairement au CNP, nous avons constaté que l'ANP est aussi capable de déstabiliser des biofilms matures de *P. aeruginosa*. Une exposition à l'ANP (2h; 10 nM) provoque une importante dispersion d'un biofilm mature de *P. aeruginosa* PA14 (- 73 %). Cet effet dispersif de l'ANP est dose-dépendant et impacte des biofilms formés par différentes souches de *P. aeruginosa* (PA14, H103, PAK, souches cliniques). Nous avons également observé que l'exposition des biofilms à un cocktail d'ANP et de divers antibiotiques (Tobramycine, Polymyxine B, Imipenem) est plus puissant en termes de dispersion des biofilms que l'effet d'antibiotique seul mettant en évidence un rôle d'adjuvant pour l'ANP. Enfin, nous avons identifié la protéine senseur AmiC de *P. aeruginosa* comme étant la cible de l'ANP, puisqu'un biofilm mature du mutant  $\Delta$ amiC est insensible à l'ANP. De même, la présence du régulateur de l'opéron ami, à savoir la protéine AmiR est indispensable pour visualiser l'effet dispersif de l'ANP.

#### Discussion et conclusions

Ces résultats suggèrent que l'ANP pourrait être un nouvel outil thérapeutique dans la recherche de molécules capables de disperser les biofilms formés par *P. aeruginosa*, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose.

#### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## NOVELLI Marine

### CRIBLAGE D'INHIBITEURS DES POMPES D'EFFLUX ET PHARMACOMODULATION POUR AMELIORER L'EFFICACITE DES ANTIBIOTIQUES

Marine Novelli<sup>1</sup>, Jacques Siad<sup>1</sup>, Jean-Michel Brunel<sup>1</sup>, Martin Picard<sup>2</sup>, Jean-Michel Bolla<sup>1</sup>

1. Membranes et cibles thérapeutiques, Faculté de Pharmacie d'Aix-Marseille Université, Marseille 2. Laboratoire de biologie physico-chimique des protéines membranaires, IBPC, Université Paris Diderot – Paris 7, Paris

#### Objectifs

Les infections pulmonaires provoquées par des bactéries pathogènes multi-résistantes représentent une menace préoccupante chez les personnes atteintes de la mucoviscidose. Cette maladie génétique conduit à la sécrétion abondante par les poumons d'un mucus visqueux favorable aux infections bactériennes. La surexpression des systèmes d'efflux est l'un des mécanismes majeurs associé au phénotype MDR (Multi-Drug Resistance). Les pompes d'efflux permettent le rejet vers le milieu extérieur de composés toxiques pour la bactérie, laissant un niveau de concentration intracellulaire en dessous du seuil d'efficacité. Les pompes RND (Resistance-Nodulation-cell Division), retrouvées uniquement chez les bactéries à Gram négatif, effluent un large panel de substrats incluant toutes les familles d'antibiotiques [1]. Notre projet consiste à développer des inhibiteurs des pompes d'efflux (IPE) comme adjuvant aux antibiotiques déjà présents sur le marché afin de restaurer leur efficacité sur les bactéries MDR.

#### Matériels et méthodes

La chimiothèque, comprenant de nombreux dérivés de polyamines, est testée contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* sauvages, dépourvues ou surexprimant les systèmes d'efflux. Dans un premier temps, des tests de potentialisation d'antibiotiques substrats des pompes d'efflux sont effectués grâce à la plateforme de criblage BAC-Screen de l'Unité. Lorsque ceux-ci montrent une activité inhibitrice, des relations structure-activité nous permettent de guider la synthèse de nouveaux dérivés. Dans un second temps, leur mécanisme d'action est étudié sur bactéries entières [2] et sur les pompes AcrAB-TolC d'*E. coli* et MexAB-OprM de *P. aeruginosa* reconstituées en protéoliposomes [3].

#### Résultats

Sur les 160 composés criblés, 7 présentent une activité potentialisatrice sur *E. coli* et 4 sur *P. aeruginosa*. Deux molécules dérivées des iantheiformisamines [4] ont montré une activité sur les deux espèces. Les premières pharmacomodulations ont pu être effectuées sur l'une d'entre elles, aboutissant à plus de 17 dérivés testés comme préalablement.

#### Discussion et conclusions

Les composés les plus efficaces sont en cours d'étude pour déterminer leur mécanisme d'action et ainsi valider leur spécificité vis à vis des pompes d'efflux. A l'issue de ce travail, un programme de « scale-up » de synthèse sera développé pour le(s) composé(s) répondant à l'ensemble des critères mis en œuvre et permettre d'envisager des tests de toxicité préalables aux essais sur animaux infectés.

#### Références

1. Masi M, Réfregiers M, Pos KM, Pagès JM. 2017. Mechanisms of envelope permeability and antibiotic influx and efflux in Gram-negative bacteria. *Nat. Microbiol.* 2, 17001.
2. Lieutaud A, Pieri C, Bolla JM, Brunel JM. 2020. New Polyaminoisoprenyl Antibiotics Enhancers against Two Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria from Enterobacter and Salmonella Species. *J Med Chem.* 63, 10496-10508.
3. Verchère A, Dezi M, Adrien V, Broutin I, Picard M. 2015. In vitro transport activity of the fully assembled MexAB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Comm.* 22, 6890.
4. Pieri C, Borselli D, Di Giorgio C, De Méo M, Bolla JM, Vidal N, Combes S, Brunel JM. 2014. New lanthelliformisamine derivatives as antibiotic enhancers against resistant Gram-negative bacteria. *J Med Chem.* 22, 4263-72.

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : Financement ANR Projet Spice-Up

**BORN-BONY Maëlys****LE TRANSFERT ADOPTIF DE MDSC MODULE LE RETABLISSEMENT DES SOURIS APRES UNE INFECTION PULMONAIRE A PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

Maëlys BORN-BONY 1, Bérengère VILLERET 1, Mélodie BOUTE 1, Ignacio GARCIA-VERDUGO 1, Jean-Michel SALLENAVE 1  
1. Université de Paris, INSERM 1152, Physiopathologie et épidémiologie des maladies respiratoires, F-75018 Paris, France

**Objectifs**

1) Caractérisation de MDSC (cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse) WT et CFTR KO à l'état basal et après infection à P.a. in vitro 2) Déterminer si le transfert adoptif des MDSC a un impact modulateur sur l'infection pulmonaire à P.a. in vivo.

**Matériels et méthodes**

In vitro: - Les MDSC ont été obtenus par différenciation de la moelle osseuse de souris WT ou CFTR KO dans des milieux contenant de l'IL-6 et du GM-CSF dans un protocole de 5 à 7 jours. - Les MDSC ont été caractérisés par une analyse par cytométrie en flux - Les MDSC ont été infectés par la souche PAO1 pendant 4 heures. Les concentrations de cytokines dans les surnageants ont été évaluées par ELISA et l'expression des gènes cellulaires a été mesurée par qPCR. - Des essais d'inhibition des splénocytes ont été effectués pour évaluer et définir la capacité d'inhibition des MDSC In vivo: - Dans un protocole à forte dose bactérienne (1e8 CFU / souris, létale), des souris C57 / B6 ont été infectées par voie intra-nasale avec PAO1, puis transférées avec différentes doses de MDSC isogéniques (0,25e6 à 1e6) par voie endo-trachéale. La survie, la perte de poids et le score de gravité ont ensuite été mesurés. - Dans un essai à faible dose de bactéries (5e6 UFC/souris, non létale), des souris C57/B6 ont été infectées par voie intra-nasale par PAO1, transférées avec des MDSC comme ci-dessus, puis sacrifiées à différents temps. Un lavage broncho-alvéolaire et des extraits pulmonaires ont été recueillis pour étudier la concentration de cytokines, la charge bactérienne et pour analyser les populations immunitaires (cytospins et FACS).

**Résultats**

In vitro: 1) Les cellules de moelle osseuse de souris CFTR WT et KO différenciées dans un milieu contenant de l'IL-6 et du GM-CSF expriment des marqueurs MDSC typiques et de bonne foi (Arg-1, S100A8, S100A9...) et inhibent la prolifération des splénocytes. 2) Bien que la sécrétion de cytokines et l'expression des gènes inflammatoires pulmonaires n'aient montré aucune différence entre les MDSC WT et CFTR KO avant et après l'infection PAO1, nous avons confirmé que les MDSC CFTR KO avaient une capacité inhibitrice réduite par rapport aux MDSC WT. In vivo: Le transfert adoptif de MDSC module l'infection pulmonaire à PAO1. Une faible dose de MDSC (250 000 MDSC / souris) semble améliorer la survie et la récupération des souris, tandis que des doses plus élevées (500 000 ou 1e6 MDSC / souris) ont montré une tendance à l'aggravation de l'infection et à une survie plus faible.

**Discussion et conclusions**

Bien que préliminaires, nos résultats suggèrent qu'un transfert adoptif MDSC à la suite d'une infection pulmonaire P.a. peut avoir un impact sur le rétablissement des souris. D'autres expériences permettront de disséquer davantage les mécanismes impliqués et de déterminer si le MDSC peut être une nouvelle cible thérapeutique pour les patients atteints de mucoviscidose.

**Références**

Non communiquées

**FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## SARRAZIN Morgane

### LES CYCLIPOSTINES/CYCLOPHOSTINES DE NOUVELLES PERSPECTIVES DANS LE TRAITEMENT DES INFECTIONS A MYCOBACTERIUM ABSCESSUS CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE.

M. Sarrazin<sup>1</sup>, C. D. Spilling<sup>2</sup>, J-L. Herrmann<sup>3</sup>, L. Kremer<sup>4</sup>, J-F. Cavalier<sup>1</sup>, S. Canaan<sup>1</sup>

1. Aix-Marseille Univ, CNRS, LISM, Marseille 2. University of Missouri–St. Louis, USA. 3. UVSQ, INSERM UMR1173, Versailles 4. IRIM, INSERM, Montpellier

#### Objectifs

M. abscessus est un pathogène émergent responsable d'atteintes pulmonaires sévères chez les patients atteints de mucoviscidose. Cette mycobactérie présente une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques rendant parfois les traitements inefficaces et laissant peu d'alternative de guérison. Dans ce contexte, nous étudions de nouveaux composés appelés Cyclipostins et Cyclophostines (CyC) qui présentent une activité antibactérienne sur M. abscessus similaire aux meilleurs antibiotiques de référence. De plus, l'identification des cibles impactées par ces molécules a conduit à l'obtention d'une quarantaine de protéines, dont la protéine Erm(41) responsable de la résistance aux macrolides, antibiotiques centraux dans l'antibiothérapie contre M. abscessus. Le blocage d'Erm(41) permettrait de contrer la résistance et de rétablir la sensibilité aux macrolides. Ce projet a donc pour objectif d'approfondir l'étude du mécanisme d'action des composés sur la bactérie, de tester sur des bactéries résistantes aux macrolides l'effet de l'association des CyC avec les macrolides et de caractériser l'inhibition d'Erm(41) par les CyC.

#### Matériels et méthodes

L'étude de la pénétration des CyC chez les mycobactéries et sur des bactéries responsables d'infections pulmonaires chez les patients a été réalisée grâce à la synthèse de CyC fluorescents qui nous a permis de suivre et de quantifier leur pénétration par microscopie de fluorescence et par fluorimétrie. L'étude de l'activité de l'association CyC-macrolide sur des souches de M. abscessus sensibles et résistantes aux macrolides a été réalisée par la méthode de l'échiquier. Enfin, afin de déterminer le meilleur CyC pour l'inhibition d'Erm(41), nous avons produit et purifié la protéine en grande quantité. Ceci nous a permis d'analyser l'interaction d'Erm(41) avec plusieurs CyC par des moyens biochimiques (test de compétition, spectrométrie de masse, etc...).

#### Résultats

Nous avons pu montrer que la pénétration des CyC est un phénomène spécifique aux mycobactéries. En effet, tous les CyC testés sont capables de franchir leur paroi et cela indépendamment de leur activité. En revanche, bien que les CyC soient capables d'interagir avec les protéines présentes dans un lysat de P. aeruginosa et S. aureus, il semblerait que nos composés soient en fait incapables de franchir leur paroi cellulaire. Les premiers tests de synergie des CyC avec l'azithromycine et la clarithromycine, deux macrolides fréquemment utilisés dans le traitement, sur la souche sauvage de M. abscessus ont pu montrer que les CyC sont capables de potentialiser l'activité de la clarithromycine in vitro sur la croissance bactérienne. En parallèle, l'étude de l'interaction des CyC avec la protéine Erm(41) purifiée a permis de montrer que les CyC sont bien capables d'interagir avec la protéine et que cette interaction est covalente. Ces résultats ont permis de valider que la protéine Erm(41) est bien une cible des CyC.

#### Discussion et conclusions

Les résultats obtenus sont plutôt encourageants sur l'utilisation des CyC en thérapeutique et nous confortent dans l'idée que l'association CyC-macrolide sera efficace contre les souches résistantes. En outre, le marquage spécifique des mycobactéries par les CyC fluorescents, nous permet d'envisager également leur utilisation pour le diagnostic des infections à M. abscessus.

#### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Oui

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

**HARDOUIN Pauline**

## **CARACTERISATION DU MICROBIOTE PULMONAIRE DE PATIENTS ATTEINTS DE LA MUCOVISCIDOSE PAR METAPROTEOMIQUE**

Pauline Hardouin<sup>1</sup>, Olivier Pible<sup>1</sup>, Hélène Marchandin<sup>2</sup>, Raphaël Chiron<sup>3</sup>, Jean Armengaud<sup>1</sup>, Lucia Grenga<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory 'Innovative technologies for Detection and Diagnostics' CEA- Marcoule, Bagnols-sur-Cèze, France <sup>2</sup> Equipe PHYSE, HydroSciences Montpellier, CNRS, IRD, Université de Montpellier, Montpellier, France <sup>3</sup> Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM), Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France

### **Objectifs**

Une meilleure connaissance du microbiote des voies respiratoires des patients atteints de la mucoviscidose est essentielle pour mieux comprendre la physiopathologie sous-jacente de la maladie. En effet, le microbiote fait partie des facteurs contribuant à l'exacerbation des symptômes des patients et aux résultats des traitements. Dans le but de déchiffrer l'évolution des communautés microbiennes associées à la mucoviscidose et les interactions hôte-microbiote, nous rapportons ici le développement d'une approche basée sur la métaprotéomique et son application pour étudier l'effet de la méthode d'échantillonnage des expectorations sur la composition du microbiote pulmonaire des patients atteints de la mucoviscidose.

### **Matériels et méthodes**

Afin d'établir rapidement le profil des composants majeurs du microbiote à partir d'expectorations, une approche de métaprotéomique a été appliquée. Une première étape de prétraitement a été réalisée sur les échantillons frais de sputum visant à perturber le mucus et isoler la fraction contenant le microbiote. Les protéines extraites ont été soumises à une digestion à la trypsine en gel. Les peptides résultants ont été analysés par spectrométrie de masse en tandem. Le profil taxonomique du microbiote a été obtenu en exploitant l'information des données brutes par application d'une stratégie d'analyse développée par notre équipe permettant d'identifier les taxons présents au sein de l'échantillon et d'estimer leurs abondances relatives. Les protéines validées ont ensuite été annotées par KEGG à l'aide du service web GhostKoala afin de récupérer les informations fonctionnelles du m  taprot  ome.

### **Résultats**

Les différentes composantes du microbiote pulmonaire (bactéries, archées et champignons), y compris les non-cultivables ou les moins explorés comme Burkholderia, Streptococcus and Chryseobacterium, ont été identifiés et quantifiés dans trois paires d'échantillons d'expectoration spontanés et induits. L'analyse comparative des données m  taprot  omiques a révélé l'absence de différences significatives en termes de signal microbien détecté et de diversité taxonomique entre les deux types d'échantillons. De même, la méthode d'échantillonnage n'a pas d'impact sur le profil fonctionnel du microbiote et de l'hôte. En effet, les termes fonctionnels liés à la mucoviscidose tels que l'inflammation, le métabolisme des lipides et l'infection ont été identifiés à la fois dans les échantillons spontanés et induits.

### **Discussion et conclusions**

L'approche de métaprotéomique permet une caractérisation taxonomique et fonctionnelle approfondie du microbiote pulmonaire de la mucoviscidose à partir d'échantillons d'expectoration indépendamment de la méthode d'échantillonnage. Les résultats préliminaires obtenus ouvrent la voie à de nombreuses applications comme l'évaluation de l'impact de thérapies de modulateurs de CFTR de nouvelle génération sur le microbiote pulmonaire ainsi que les influences que le microbiote peut avoir sur le résultat des traitements.

### **Références**

Non communiquées

#### **FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Oui

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : Ce travail est financé par la région Occitanie et le CEA.

**TOURE Hamadou****MYCOBACTERIUM ABSCESSUS RESISTE A LA REPONSE CYTOTOXIQUE INNEE DE L'HOTE INFECTE**

Hamadou Touré<sup>1</sup>, Lee Ann Galindo<sup>1</sup>, Marion Lagune<sup>1</sup>, Simon Glatigny<sup>1</sup>, Isabelle Guéna<sup>2</sup>, Jean-Louis Herrmann<sup>1, 3</sup>, Fabienne Girard-Misguich<sup>1</sup>, Sébastien Szuplewski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, UVSQ, INSERM, Infection et Inflammation, 78180, Montigny-Le-Bretonneux, France. <sup>2</sup>Université Paris-Saclay, UVSQ, LGBC, 78000, Versailles, France. <sup>3</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, GHU Paris-Saclay, Hôpital Raymond Poincaré, 92380, Garches, France.

**Objectifs**

*Mycobacterium abscessus* (Mabs) est un pathogène opportuniste de l'Homme et l'espèce la plus pathogène parmi les mycobactéries à croissance rapide (MCR) qui sont majoritairement saprophytes. Mabs cause des infections pulmonaires sévères et difficiles à éradiquer chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Les causes de sa pathogénicité restent encore mal comprises, de même comment Mabs infecte et colonise son hôte. Dans ce travail, nous avons tâché de répondre à ces questions en utilisant la drosophile et la souris comme organismes modèles.

**Matériels et méthodes**

Des drosophiles sauvages et déficientes pour certains composants de l'immunité innée (cellulaire et/ou humorale) ont été infectées par nano-injection avec 10 colony forming units (CFU) de Mabs suspendues dans 50 nL d'eau au niveau du thorax. La mortalité des mouches a été quotidiennement suivie pendant 10 jours. Des macrophages primaires de souris « Black 6 » ont été infectés à MOI 10 puis mis en contact ou non avec des cellules NK autologues. Les pourcentages de cellules vivantes et/ou infectées ont été déterminés par cytométrie en flux.

**Résultats**

La drosophile est sensible de manière dose-dépendante à l'infection par Mabs. Après injection, les mycobactéries sont rapidement internalisées par les macrophages. Elles y sont présentes pendant les 4 premiers jours de l'infection. Ce maintien intracellulaire de Mabs par les macrophages est crucial pour la survie de la drosophile. En effet, la déplétion des macrophages (en pré-injectant des liposomes de clodronate avant les bactéries) augmente la susceptibilité des mouches à l'infection. Ces résultats ont été confirmés de manière génétique en surexprimant un gène pro-apoptotique dans les macrophages. De manière surprenante, au contraire, la déplétion génétique des thanacytes, une sous-population de cellules sanguines récemment décrite, confère de la résistance à l'infection. Nous montrons que les thanacytes induisent une apoptose caspase-dépendante dans les macrophages infectés par l'intermédiaire des granzymes B et H. Cette cytolysse conduit à l'épuisement de la principale population cellulaire capable de contrôler l'infection sans tuer les bactéries intracellulaires, entraînant une bactériémie puis la mort des mouches. Nous avons confirmé la résistance des Mabs à la lyse cytotoxique des phagocytes chez la souris après contact des macrophages primaires infectés avec des cellules NK autologues. En effet, les NK tuent les macrophages infectés sans pour autant affecter la charge bactérienne.

**Discussion et conclusions**

Collectivement, nos résultats démontrent : (i) l'existence d'une population de cellules cytotoxiques chez la drosophile, une première chez les insectes ; (ii) la propension de Mabs à résister à la réponse innée cytotoxique de l'hôte, typique des mycobactéries pathogènes strictes comme *M. tuberculosis*. Cette capacité de Mabs pourrait partiellement expliquer sa pathogénicité supérieure parmi les MCR qui sont majoritairement saprophytes.

**Références**

Non communiquées

**FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

**BASTIEN Sylvère**

## **EVOLUTION DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET DE SES INTERACTIONS AVEC STAPHYLOCOCCUS AUREUS CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE**

Sylvère Bastien<sup>1</sup>, Laura Camus<sup>2</sup>, Paul Briaud<sup>1</sup>, Anne Doléans-Jordheim<sup>1,3</sup>, François Vandenesch<sup>1,3</sup>, Karen Moreau<sup>1</sup>

1. U1111 – INSERM – CIRI – Equipe « Pathogénie des staphylocoques », Lyon, France 2. Department of Infection Biology, Interfaculty Institute of Microbiology and Infection Medicine, University of Tübingen, Cluster of Excellence EXC 2124 Controlling Microbes to Fight Infections, Tübingen, Germany 3. Institut des Agents Infectieux, Lyon, France

### **Objectifs**

Les capacités d'adaptation du pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* (PA) lui permettent de coloniser une grande variété d'environnements. Dans le cas des infections pulmonaires survenant chez les patients atteints de mucoviscidose (CF), PA évolue in-vivo vers un état de faible virulence mais de haute résistance. Cette adaptation génétique de PA affecte également ses interactions avec les microorganismes co-colonisateurs, tels que *Staphylococcus aureus* (SA). Les souches d'infections précoces de PA sont ainsi en compétition avec SA, alors que les souches d'infections chroniques sont capables de coexister. Nous cherchons à caractériser les facteurs génétiques de PA impliqués dans la mise en place de cette coexistence bactérienne.

### **Matériels et méthodes**

Pour 11 patients CF, un couple de PA isolées du même échantillon mais présentant les deux états d'interaction avec SA ont été identifiés grâce à des tests de compétition. Les génomes de ces paires d'isolats de PA ont été séquencés afin de comparer, pour chaque patient, les caractéristiques génétiques de l'isolat de coexistence par rapport à l'isolat de compétition.

### **Résultats**

Les résultats indiquent que les deux isolats co-isolés appartiennent au même clone, suggérant l'existence de transitions in vivo entre les phénotypes coexistant et compétiteur de PA. De plus, en comparaison aux isolats compétiteurs, les génomes des PA coexistants accumulent des mutations non-synonymes affectant des gènes ainsi nommés « patho-adaptatifs », témoignant d'un phénomène de sélection positive. Parmi les gènes spécifiquement mutés chez les isolats coexistants figure l'opéron *yecS-flhY*, muté dans 66,7% des cas. La fonction de cet opéron et son rôle dans l'interaction de coexistence restent à explorer.

### **Discussion et conclusions**

En conclusion, notre étude montre que l'établissement de la coexistence avec SA est liée à la patho-adaptation de PA dans l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose, et met également en évidence plusieurs de ses facteurs.

### **Références**

Non communiquées

#### **FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Oui

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## PONT Stéphane

### PATHOGENICITE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET REPONSE IMMUNITAIRE INNEE ASSOCIEE AU COURS D'UNE INFECTION PERSISTANTE DANS UN MODELE D'EMBRYON DE POISSON ZEBRE

Stéphane PONT, Pauline NOGARET, Anne BLANC-POTARD

Laboratory of Pathogen Host Interaction, CNRS UMR5235, Université de Montpellier, Montpellier, France

#### Objectifs

L'objectif de ce travail est d'établir un modèle d'infection persistante à *P. aeruginosa* in vivo facile à utiliser, afin de mieux caractériser l'interaction hôte-pathogène sous-jacente à la persistance de *P. aeruginosa*, de comparer la virulence de souches cliniques, et de tester de nouvelles molécules anti-Pseudomonas.

#### Matériels et méthodes

Nous utilisons comme modèle d'infection l'embryon de poisson zèbre, un vertébré aux caractéristiques uniques pour l'étude des interactions hôte-pathogène grâce à de nombreux outils génétiques et à la possibilité d'imagerie in vivo en temps réel. Suite à une blessure à la queue, les embryons sont incubés en présence d'isolats cliniques issus de patients atteints de mucoviscidose (collaboration P. Plésiat, CHU Besançon), induisant la colonisation de la plaie. La capacité des souches à persister au sein de l'hôte pendant trois jours est évaluée, ainsi que la localisation bactérienne (intracellulaire vs extracellulaire) dans les tissus. De plus, les isolats cliniques sont caractérisés phénotypiquement (résistance au complément et à la phagocytose, capacité à former un biofilm...) et leur séquence génomique est analysée.

#### Résultats

Nous avons identifié un isolat clinique (nommé B) qui persiste au sein de l'hôte sans induire de mortalité, alors que les autres isolats testés sont totalement éradiqués en deux ou trois jours. Tous les isolats cliniques sont très sensibles à l'action bactéricide du complément, mais contrairement aux souches non-persistantes, l'isolat B résiste aux macrophages et forme des biofilms in vitro.

#### Discussion et conclusions

Nous avons pu développer un modèle simple de colonisation persistante chez un hôte vertébré, basé sur l'analyse d'isolats cliniques issus de patients atteints de mucoviscidose. D'autres études de microscopie confocale seront réalisées pour évaluer la localisation des bactéries au cours de la colonisation persistante, ainsi que le recrutement de cellules immunitaires tels que les macrophages et neutrophiles. Nos résultats offrent un nouveau modèle d'infection persistante pour tester des molécules anti-Pseudomonas dans un contexte normal ou CF (à l'aide d'une lignée de poisson cftr-/-).

#### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Oui

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## FRENOD Cécile

### EXPAPARM : UNE RECHERCHE COLLABORATIVE POUR DEFINIR DES PATIENT-REPORTED EXPERIENCE MEASURES (PREM)

Cécile Frenod 4, Audrey Chansard 2 Sophie Théroouanne 3 Dominique Pougheon 1

1. LEPS UR3412 Université Sorbonne Paris Nord 2. Epigenetics and Cell Fate Centre, UMR7216 CNRS, Université de Paris, Paris, France 3. CRCM Lille CHU Lille 4. Sciences PO Saint-Germain-en-Laye

#### Objectifs

Cette recherche collaborative<sup>1</sup> permet d'explorer les conditions de la prise en charge des patients, de définir les domaines et critères d'un parcours de qualité à leurs yeux, pour construire un questionnaire de recueil de l'expérience patient<sup>2</sup> du parcours mucoviscidose.

#### Matériels et méthodes

Le groupe de recherche réunit des chercheurs académiques, des professionnels des CRCM et 7 co-chercheurs patients adultes et parents d'enfants atteints de mucoviscidose. Design en 4 phases : 1) mise en place de l'étude, recrutement des co-chercheurs, formation aux méthodes de recherche qualitative, définition des situations des patients à enquêter, soumission du protocole au comité d'éthique ; 2) sélection des CRCM, recrutement des participants, entretiens semi-directifs, analyse des verbatims selon la théorisation ancrée<sup>3</sup> ; 3) élaboration des 4 questionnaires PREM parents, adolescents, adultes non greffés et adultes greffés ; 4) validation du construit avec les participants et les professionnels des CRCM.

#### Résultats

Une formation à la recherche qualitative a été dispensée aux co-chercheurs. Une liste de situations de vie a été traduite en critères d'inclusion pour couvrir une variété d'expériences. Accord du comité d'éthique obtenu en juin 2020. Onze CRCM ont été associés pour recruter l'échantillon de 77 participants, en métropole et sur l'île de La Réunion. Les entretiens ont été conduits par les chercheurs ou les co-chercheurs (moyenne=1h ¼ /participant), retranscrits et analysés en duo chercheur/co-chercheur. Les 3 domaines ont été documentés dans NVivo®: - Soins : organisation des soins au CRCM et en ville, coordination des soins par le CRCM, traitements à domicile, éducation thérapeutique des parents et des patients, décision partagée, difficultés psychologiques, hospitalisations, nouvelles thérapies ; - Social : droits sociaux et impact sur le revenu des patients ou des familles, conditions dans les études et l'emploi, situation de logement ; - Transitions : diagnostic de la maladie, transition ados-adultes et transition vers la transplantation ; Les questionnaires de PREM ont été élaborés et testés auprès de l'échantillon d'étude. Le test du PREM adulte démontre que l'outil permet de décrire les parcours de manière pertinente, utile et qu'il est sensible à l'évolution du parcours liée au Kafrio.

#### Discussion et conclusions

De bonnes expériences avec les centres sont rapportées mais les transitions restent difficiles. Les participants expriment une lourde charge en soins à domicile, un vécu difficile des situations d'incertitude liées à la santé, à l'impact économique et à l'avenir. Les questionnaires permettront d'analyser des situations individuelles, des problèmes et actions prioritaires au niveau du CRCM ou de la communauté, l'impact de changements de pratiques ou de traitements.

#### Références

1 Demange E, Henry E, Préau M. De la recherche en collaboration à la recherche communautaire. Un guide méthodologique ANRS (French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis); Paris, 2012. 2 "Being a patient. First report of the Patients Association's patient experience programme" The patients association, Juillet 2020. 3 Birks M., Mills J.: Grounded Theory: A Practical Guide, 2nd edn. Sage, London (2015)

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : - AAP IReSP 2019 (Financement principal) - AAP FMR 2020 (Extension COVID)

## LOIZEAU Virginie

### HABITER AVEC LA MUCOVISCIDOSE : LA CONTRIBUTION DE L'ANALYSE SOCIOLOGIQUE DES PRATIQUES D'HYGIENE DOMESTIQUE A LA PREVENTION DES RISQUES RESPIRATOIRES

LOIZEAU Virginie, LOIZEAU Virginie  
ESO-Rennes UMR 6590 CNRS Université Rennes 2

#### Objectifs

Les familles d'enfants souffrant de mucoviscidose reçoivent des recommandations de bonnes pratiques pour améliorer la qualité de l'air intérieur de leur logement et préserver la santé respiratoire de leur enfant malade. Elles s'approprient ces recommandations et les mettent en œuvre dans leur espace domestique. La recherche doctorale en sociologie a pour objectif de comprendre comment les familles définissent les conditions de vie qu'elles estiment nécessaires au maintien de l'état de santé de leur enfant. Elle pose comme principale hypothèse la variabilité des réponses apportées par les familles selon les principes qui gouvernent leur groupe domestique.

#### Matériels et méthodes

La recherche s'appuie sur une enquête qualitative menée sous formes d'entretiens et d'observations au domicile de vingt-quatre familles vivant en Bretagne, et dont les enfants malades ont entre quelques mois et une vingtaine d'années. Elle s'ancre dans la description ethnographique de leurs pratiques d'hygiène domestique au regard des recommandations reçues, qui varient selon les époques et les centres de soins (ayant recours ou non à l'intervention d'une conseillère médicale en environnement intérieur). Leurs manières d'habiter et de s'approprier des recommandations en lien avec l'environnement domestique sont comparées à celles de vingt-deux familles d'enfants souffrant d'asthme allergique, domiciliées à Rennes et dans ses environs. L'étude de l'ensemble des monographies domestiques réalisées mobilise essentiellement l'analyse culturelle développée par l'anthropologue britannique Mary Douglas.

#### Résultats

Cette analyse conduit à proposer une typologie des gestions familiales des risques respiratoires. Quatre modalités sont identifiées. Elles correspondent à des organisations spécifiques de la « maison », à savoir de la famille, de son habitat et de ses routines ménagères. Ces organisations se caractérisent par des rôles et des responsabilités déterminés au sein du groupe domestique en termes de prise en charge de l'hygiène, ainsi que par des pratiques particulières selon des temporalités différenciées. Elles renvoient à des conceptions distinctes de la maladie et des risques (respiratoires et autres) qui lui sont associés.

#### Discussion et conclusions

L'analyse typologique des groupes domestiques met à jour deux éléments essentiels pour comprendre la prévention des risques respiratoires : d'une part, comment ces groupes attribuent leur confiance aux professionnels de santé qui les accompagnent, et d'autre part, comment ils sélectionnent les risques qu'ils prennent en compte. Ces éléments permettent aux familles de se positionner par rapport aux recommandations médicales reçues et aux producteurs de normes de santé. Ils leur servent à orchestrer la vie quotidienne à la maison avec la mucoviscidose, en priorisant des risques sur d'autres. L'analyse permet de relier ces attributions de confiance et ces modalités de sélection des risques à des profils biographiques familiaux et à des types d'organisation domestique. Cela donne des indications aux prescripteurs médicaux pour identifier les familles et leurs modalités d'appréhension de la maladie et des risques. Ces derniers peuvent ainsi adapter les recommandations et les manières de les présenter à chaque famille, dans le cadre d'une prise en charge médicale pluridisciplinaire au long cours qui offre la possibilité d'une connaissance relativement intime de l'enfant malade et de sa famille par l'équipe soignante.

#### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui  
ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non  
BLANCHE POUR VAINCRE : NON  
AUTRE : Région Bretagne (dispositif ARED : Allocations de Recherche Doctorale)

**BLEUSE Solenne**

## ÉTUDE DE LA REGULATION DE TTP, PROTEINE ANTI-INFLAMMATOIRE EN CONTEXTE CF

S. Bleuse<sup>1,2</sup>, J. Varilh<sup>1</sup>, K. Deletang<sup>1</sup>, M. Nadaud<sup>1,2</sup>, M. Taulan-Cadars<sup>1,2</sup>  
1 Laboratoire Phymedexp – INSERM (U1046), Montpellier. 2 Université de Montpellier.

### Objectifs

Des éléments régulateurs, petits ARN non-codants (miARNs) et protéines de liaison à l'ARN (RNA Binding Protein, RNA-BP), agissent de manière synergique/antagoniste ou indépendamment au niveau de l'extrémité 3'UTR des ARNm pour contrôler l'expression des gènes ciblés via leur dégradation ou le blocage de leur traduction. Tristetraproline (TTP) est une RNA-BP anti-inflammatoire. Sous sa forme active non-phosphorylée, elle se fixe sur les régions 3'UTR des ARNm de gènes pro-inflammatoires comme l'IL2, IL8 et TNF $\alpha$  pour induire leur dégradation, participant ainsi au contrôle du processus inflammatoire. Dans les cultures CF, il a été montré une dérégulation de l'ARNm et de la protéine TTP. Nous envisageons d'étudier l'expression/régulation du gène TTP afin d'augmenter son expression en stabilisant son extrémité 3'UTR, ainsi que de favoriser la fraction active de cette protéine pour contrôler le processus inflammatoire.

### Matériels et méthodes

Pour étudier les différents éléments régulateurs impliqués dans la stabilité de l'ARNm TTP, un système de gène rapporteur (luciférase) sous le contrôle de l'extrémité 3'UTR-TTP a été utilisé. Les résultats ont été validés par RT-qPCR et immunoblot. La régulation de la phosphorylation de TTP a été évalué par immunoblots avec ou sans utilisation de drogues modulant son état de phosphorylation. Le taux de cytokines a également été quantifié.

### Résultats

L'étude des éléments régulant TTP par son extrémité 3'UTR montre que les RNA-BPs, HuR et HuB ont un effet activateur. À l'inverse, le miR-138 et le miR-155 ont un effet inhibiteur sur l'expression de TTP (activité luciférase et taux de protéine), action plus marquée en présence de LPS. Le rôle de ces miARNs a été confirmé par l'utilisation de leur inhibiteur. Pour valider l'importance de ces éléments cis-régulateurs sur la stabilité de l'ARNm TTP, nous avons introduit des mutations qui entraînent une augmentation de son expression. Nous avons conçu plusieurs oligonucléotides modifiés (ONB) qui bloquent le recrutement des miARNs sur l'extrémité 3'UTR-TTP. Certains de ces ONB induisent une augmentation du taux d'ARNm TTP. Le bénéfice de la sur-expression de TTP a été évalué sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires. La mesure de l'activité luciférase, en contexte inflammatoire, montre une forte diminution de la stabilité des cytokines, données qui ont été confirmées sur le taux d'ARNm avec une diminution de IL2, IL8 et TNF $\alpha$ . En parallèle, nous avons montré que dans les cellules CF, la phosphorylation de TTP dépend de la cascade de phosphorylation ERK/MK2. En effet, l'utilisation de drogues inhibant la voie ERK induit une diminution significative de la phosphorylation de TTP. Les résultats préliminaires montrent que maintenir TTP sous sa forme active, en bloquant sa phosphorylation à l'aide de molécules inhibitrices, induit une diminution du taux d'ARNm IL6 et de l'activité luciférase de IL8. Dans le but d'empêcher la phosphorylation de TTP, de façon plus spécifique, nous avons conçu des peptides mimiques, dont l'efficacité est en cours d'évaluation.

### Discussion et conclusions

Déterminer les éléments qui modulent l'expression du gène TTP et la phosphorylation de sa protéine, permet de concevoir de nouveaux outils moléculaires, en ciblant une protéine centrale dans le contrôle des cytokines pro-inflammatoires. Travail soutenu par l'Association Vaincre la Mucoviscidose et l'AFM-téléthon. Les auteurs n'ont aucun conflit d'intérêts réel ou perçu, en relation avec ce résumé.

### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui  
ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non  
BLANCHE POUR VAINCRE : NON  
AUTRE : AFM téléthon

**BRIOTTET Maëlle**

## **BIOSYNTHESE DES MEDIATEURS LIPIDIQUES DE LA RESOLUTION DE L'INFLAMMATION DANS LA MUCOVISCIDOSE ET LEURS EFFETS SUR LA CLAIRANCE MUCOCILIAIRE**

M. Briottet<sup>1</sup>, M. Shum<sup>2</sup>, M. London<sup>1</sup>, V. Baillif<sup>3</sup>, V. Escabasse<sup>2</sup>, M. Dubourdeau<sup>3</sup>, B. Louis<sup>1</sup>, V. Urbach<sup>1</sup>

1. Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, F-94010, Créteil 2. Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil 3. Ambiotis, Toulouse

### **Objectifs**

Dans la mucoviscidose, la diminution de la hauteur du liquide de surface (ASL) de l'épithélium et l'altération de la clairance mucociliaire favorisent l'infection chronique et l'inflammation persistante des voies respiratoires. L'inflammation est normalement autorégulée par une phase de résolution active mettant en jeu des médiateurs lipidiques spécialisés, les SPMs (pour Specialized pro-Resolving Mediators), comme les lipoxines (LX), les résolvines (Rv), les marésines et les protectines. Or, les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de mucoviscidose contiennent une concentration abaissée de LXA4 par rapport à ceux des sujets contrôles (1,2). De plus, la LXA4 et la RvD1 sont capables de restaurer la hauteur de l'ASL in vitro (3,4). Notre projet évalue d'une part, la contribution des cellules épithéliales respiratoires à la biosynthèse des SPMs dans la mucoviscidose (CF). D'autre part, nous étudions l'impact des SPMs sur la clairance mucociliaire au travers de leur effet sur le battement ciliaire, le mucus, et la hauteur de l'ASL.

### **Matériels et méthodes**

Ces études sont réalisées sur des cultures primaires de cellules épithéliales nasales (hNECs) issues de patients porteurs de différentes mutations de CFTR et de sujets contrôles. 21 SPMs et métabolites intermédiaires sont quantifiés dans les surnageants de culture par spectrométrie de masse. Le niveau d'expression et la localisation des enzymes de la biosynthèse des SPMs sont étudiés par western blot et microscopie confocale. La fréquence et la synchronisation du battement ciliaire sont explorées en vidéo-microscopie à haute vitesse par la méthode multi-DDM (5). Les mucines sont étudiées par RT-qPCR et la hauteur de l'ASL est mesurée par microscopie confocale.

### **Résultats**

Les hNECs issues de patients homozygotes pour la mutation F508del ont une capacité réduite de biosynthèse de plusieurs SPMs: LXA4, LXB4, RvD5, RvE1, RvE3 comparée à celles des hNECs de sujets contrôles. Ces observations sont cohérentes avec une augmentation de l'expression de la leucotriène A4 hydrolase et du changement de localisation de la 5-lipoxygénase. Les hNECs issues de patients CF montrent une diminution de la fréquence et une augmentation de la coordination des battements ciliaires par rapport aux hNECs contrôles. Les niveaux de transcription des mucines sécrétées MUC5B et MUC5AC ainsi que des mucines « membrane-tethered » MUC1, MUC4 et MUC16 ne sont pas modifiés. Les traitements avec RvD1, LXB4 ou RvE1 à des concentrations physiologiques (nM) restaurent la fréquence de battement et la synchronisation des battements ciliaires. Ces SPMs n'impactent pas la transcription des mucines, mais la LXA4, la RvD1 et la RvE1 stimulent une augmentation de la hauteur de l'ASL dans les hNECs issues de patients.

### **Discussion et conclusions**

Ces résultats suggèrent de nouveaux rôles des cellules épithéliales dans le processus de résolution de l'inflammation. Les cellules épithéliales issues de patients montrent une altération de leur capacité à produire plusieurs autres SPMs que la LXA4 qui pourrait contribuer à la persistance de l'inflammation dans la mucoviscidose. Enfin, la LXB4, la RvD1 et la RvE1 restaurent plusieurs fonctions de l'épithélium respiratoire impliquées dans l'altération de la clairance mucociliaire de l'épithélium CF.

### **Références**

1. Karp, C. L., Flick, L. M., Park, K. W., Softic, S., Greer, T. M., Keledjian, R., et al. (2004). Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat. Immunol.* 5, 388–392. doi:10.1038/ni1056.
2. Ringholz, F. C., Buchanan, P. J., Clarke, D. T., Millar, R. G., McDermott, M., Linnane, B., et al. (2014). Reduced 15-lipoxygenase 2 and lipoxin A4/leukotriene B4 ratio in children with cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 44, 394–404. doi:10.1183/09031936.00106013.
3. Verrière, V., Higgins, G., Al-Alawi, M., Costello, R. W., McNally, P., Chiron, R., et al. (2012). Lipoxin A4 Stimulates Calcium-Activated Chloride Currents and Increases Airway Surface Liquid Height in Normal and Cystic Fibrosis Airway Epithelia. *PLoS ONE* 7, e37746. doi:10.1371/journal.pone.0037746.
4. Ringholz, F. C., Higgins, G., Hatton, A., Sassi, A., Moukachar, A., Fustero-Torre, C., et al. (2018). Resolvin D1 regulates epithelial ion transport and inflammation in cystic fibrosis airways. *J. Cyst. Fibros.* 17, 607–615. doi:10.1016/j.jcf.2017.11.017.
5. Chioccioli, M., Feriani, L., Kotar, J., Bratcher, P. E., and Cicuta, P. (2019). Phenotyping ciliary dynamics and coordination in response to CFTR-modulators in Cystic Fibrosis respiratory epithelial cells. *Nat. Commun.* 10, 1763. doi:10.1038/s41467-019-09798-3.

#### **FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : - Université Paris Est Créteil - LegPoix

## DELION Martial

### PROFIL INFLAMMATOIRE DES CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES SUITE A LA RESTAURATION DE LA FONCTION DE CFTR : CORRECTEURS VERSUS EXPRESSION GENIQUE

Amal Kouadri<sup>1,2,3</sup>, Martial Delion <sup>1,2,3</sup>, Kévin Gemy<sup>1,2,3</sup>, Johanna Cormenier<sup>1,2,3</sup>, Nadia Alfaïdy<sup>1,2,3</sup>, and Mohamed Benharouga<sup>1,2,3</sup>.  
1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Laboratoire de BioSanté U1292, Grenoble, France. 2 Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), DSV-iRIG, Département de Santé, Grenoble, France. 3 Université Grenoble Alpes (UGA), Grenoble, France.

#### Objectifs

La mucoviscidose (MV) est la maladie génétique autosomique, récessive et létale la plus commune. Elle est causée par des mutations du gène codant le canal Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR). La mutation la plus fréquente du gène CFTR, une délétion de la phénylalanine en position 508 (F508del) est responsable d'une rétention du canal CFTR dans le réticulum endoplasmique. Dans la MV, la perte de fonction pulmonaire est la manifestation clinique la plus critique, caractérisée par une obstruction des voies respiratoires, des infections et un syndrome inflammatoire qui mènent à une destruction progressive et fatale du tissu pulmonaire. Il a longtemps été proposé que le processus inflammatoire associé à la maladie soit la conséquence d'infections bactériennes. Cependant, des études récentes suggèrent que dans la mucoviscidose, l'inflammation peut précéder toute forme d'infection, justifiant la recherche active d'agents qui pourraient atténuer le phénomène inflammatoire. En plus des thérapies géniques, de nombreuses stratégies, dont l'utilisation de correcteurs, potentiateurs et modulateurs de CFTR ont été testées. Néanmoins, l'effet de ces molécules pharmaceutiques sur le degré d'inflammation dans les cellules épithéliales bronchiques CF n'a jamais été étudié.

#### Matériels et méthodes

Dans notre étude nous avons d'abord comparé les profils inflammatoires aux niveaux cellulaires et sécrétés de cellules épithéliales bronchiques humaines normales (HBE) à ceux de cellules épithéliales bronchiques portant la mutation F508del (CFBE). Nous avons également comparé ces niveaux entre des cellules CFBE, et des cellules CFBE sur-exprimant CFTR (CFBE-wt). Dans un second temps nous avons comparé le statut inflammatoire entre les cellules CFBE et CFBE-wt après traitement par des molécules correctrices de l'acheminement de CFTR à la membrane plasmique qui sont bien établies ou nouvellement découvertes.

#### Résultats

Nos résultats montrent que seul le Miglustat et les stratégies de correction de CFTR, utilisées pour restaurer la sécrétion chlore à la membrane plasmique, corrigent partiellement le niveau d'inflammation.

#### Discussion et conclusions

Ensemble, nos résultats suggèrent que le défaut de protéine CFTR pourrait contribuer à l'établissement de l'inflammation associée à la mucoviscidose mais n'est pas l'unique cause de ce phénomène. D'autres études doivent être entreprises pour mieux décrire les mécanismes de l'inflammation associée à la mucoviscidose.

#### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## DUMORTIER Claire

### LES iPSCS ; NOUVELLE SOURCE CELLULAIRE POUR L'ETUDE DU ROLE DE CFTR DANS LA MALADIE OSSEUSE

Claire Dumortier 1,2, Frédéric Velard 1, Andrew Frauenpreis 2, Soula Danopoulos 2, Denise Al Alam 2

1. EA 4691 BIOS, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France 2. The Lundquist Institute, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA, USA

#### Objectifs

Avec l'amélioration des soins médicaux et l'augmentation de l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose (patients CF), des comorbidités affectant d'autres organes que les poumons ont émergé, en particulier la maladie osseuse liée à la mucoviscidose (CFBD). Le rôle de CFTR dans la CFBD a été étudié sur les souris, rats, moutons ou in vitro sur cellules primaires de patients. Ces dernières ont montré un retard de formation et maturation osseuses pour les patients CF (Stalvey et al., 2013, Velard et al., 2014). Cependant, les connaissances acquises grâce à ses modèles atteignent leurs limites à cause de leur pertinence par rapport à la physiologie humaine ou de leur difficulté d'accès (i.e. biopsies d'os de patients CF). L'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) présente l'avantage de pouvoir générer, théoriquement, tout type cellulaire à partir d'une source commune accessible, et donc de pouvoir étudier l'impact au cours du développement de CFTR dans la différenciation en cellules osseuses.

#### Matériels et méthodes

Nous mettons en évidence pour la première fois la possibilité de générer à la fois des ostéoblastes et des ostéoclastes depuis des iPSCs d'un même donneur sain ou patient CF. Les ostéoblastes sont obtenus par la formation de corps embryonnaires et de cellules souches mésenchymateuses (MSCs) avant la différenciation ostéoblastique sur 21 jours. Les ostéoclastes sont eux, générés directement depuis les précurseurs monocytaires dérivés d'iPSCs. A différents temps de différenciation, les cellules sont fixées et immunomarquées ou lysées pour récupérer l'ARNm et effectuer des qPCR. Les quantifications ELISA sont réalisées à partir du surnageant de culture.

#### Résultats

L'engagement des iPSCs vers le profil ostéoblastique est un processus maîtrisé pour les deux lignées avec une augmentation au cours du temps de marqueurs clés (2,5 fois plus d'expression depuis le stade MSCs pour RUNX2 au jour 14 de la différenciation, 10 fois pour ALPL et COL1A1 et 1,8 pour BGLAP,  $p < 0.01$ ). Une diminution significative des facteurs de transcription chondroblastique et adipocytaire SOX9 et PPARG ( $p < 0.01$ ) est également notée. Néanmoins, la lignée d'ostéoblastes CF présente un retard de différenciation et une diminution du ratio OPG/RANKL comparativement à la lignée saine (OPG réduit de 60%,  $p < 0.05$ ), phénotype cohérent avec les résultats obtenus dans les modèles de cultures primaires (Velard et al., 2014 ; Delion et al., 2016). Le retard de différenciation pourrait être lié à des modulations de voies de signalisation BMP2, (pro-ostéoblastogène, expression réduite d'un facteur 10 dans les cellules CF,  $p < 0.01$ ) ou FGFR1 et SMAD2, (inhibant la différenciation, surexpression de 40% dans les cellules CF). La génération d'ostéoclastes a été réalisée pour les deux lignées avec la présence de cellules multinucléées TRAP+ dont le phénotypage est en cours.

#### Discussion et conclusions

La preuve de concept présentée ici de la réussite de la différenciation en ostéoblastes et ostéoclastes depuis les iPSCs contrôles et CF ouvre de nouvelles potentialités dans l'étude de l'impact de CFTR sur la maladie osseuse et dans la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques.

#### Références

Delion M. et al. "Overexpression of RANKL in osteoblasts: a possible mechanism of susceptibility to bone disease in cystic fibrosis." The Journal of pathology vol. 240,1 (2016): 50-60. Stalvey M. S. et al. "Osteoblast CFTR inactivation reduces differentiation and osteoprotegerin expression in a mouse model of cystic fibrosis-related bone disease." PloS one vol. 8,11 e80098. 13 Nov. 2013. Velard F. et al. "Cystic fibrosis and bone disease: defective osteoblast maturation with the F508del mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." American journal of respiratory and critical care medicine vol. 189,6 (2014): 746-8.

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : La région Grand-Est, The Children's Hospital of Los Angeles, The Lundquist Institute

## MOTTAIS Angélique

### MODELE MURIN HUMANISE F508DEL : UN NOUVEAU MODELE PRECLINIQUE POUR LA MUCOVISCIDOSE ?

Angélique Mottais 1,4, Y. Achouri 2,4, M. Beka 1,4, E. Marbaix 4,5, G. Vande Velde 6, J. Vanoirbeek 7, S. Gohy 3,4,5 and T. Leal 1,4  
1. Louvain Centre for Toxicology and Applied Pharmacology, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique 2. Transgenesis Technology platform, De Duve Research Institute 3. Pneumologie, ORL et Dermatologie, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique 4. UCLouvain, Brussels, Belgium 5. Cliniques Universitaire Saint-Luc, Brussels, Belgium 6. Biomedical MRI, KULeuven, Leuven, Belgium 7. Laboratory of Respiratory Diseases and Thoracic Surgery (BREATHE), KULeuven, Leuven, Belgium

#### Objectifs

Les modèles animaux ont été largement utilisés pour étudier la physiopathologie des maladies humaines et l'efficacité des nouvelles thérapies. Dans le contexte de mucoviscidose (CF), plusieurs modèles animaux ont été développés. Cependant, le modèle murin ne présente que peu ou pas de phénotype respiratoire sévère typiquement associé à la morbidité et à la mortalité élevées de la maladie humaine. Sur la base de l'observation que la mutation F508del conduit à un phénotype plus sévère chez l'Homme que chez la souris, ce projet vise à développer un modèle de souris exprimant uniquement le gène CFTR humain muté F508del.

#### Matériels et méthodes

Dans ce but, deux lignées murines ont été générées et croisées : 1) une lignée inactivée pour le Cftr murin (mCftr) (générée par CRISPR/Cas9) et 2) une lignée sur-exprimant le hCFTR F508del. Les souris obtenues ont été génotypées et caractérisées. A cet effet, le phénotype global (viabilité, courbe de poids et taille), l'expression des gènes et des protéines hCFTR et mCftr, la fonction du canal chlorure (évaluée par la différence de potentiel nasal), le phénotype pulmonaire (cytokines inflammatoires et nombre de cellules dans le lavage bronchoalvéolaire, étude anatomopathologique broncho-pulmonaire, CT scan in vivo et exploration de la fonction pulmonaire) ont été évalués.

#### Résultats

Nos données préliminaires, notamment la réduction de la croissance, le défaut d'email dentaire et la réduction du transport des chlorures à travers l'épithélium des voies respiratoires, suggèrent que les souris hCFTR-F508del présentent un phénotype typique de la mucoviscidose, similaire à celui rapporté dans les modèles de souris préétablis.

#### Discussion et conclusions

En outre, il sera nécessaire d'affiner la caractérisation phénotypique en évaluant les réponses inflammatoires après induction par des composants bactériens bien établis et par la réponse préclinique aux modulateurs. Notre nouveau modèle permettra, nous l'espérons, de mieux comprendre les différences génotype/phénotype entre le hCFTR et le mCftr et deviendra un modèle préclinique pertinent pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques.

#### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## SERGHERAERT Johan

### EVALUATION DE L'EFFET DE TRAITEMENTS CORRECTEURS ET POTENTIALISATEURS DE CFTR SUR L'EVOLUTION DE MARQUEURS LIES A LA PATHOLOGIE OSSEUSE LIEE A LA MUCOVISCIDOSE

Johan Sergheraert(1), Marie-Laure Jourdain(1), Christine Guillaume(1), Julien Braux(1), Cédric Mauprivez(1), Bruno Ravoninjavovo(2), Dominique Hubert(3), Sophie C Gangloff(1), Jacky Jacquot(1), Frédéric Velard(1)

1. URCA, EA 4691 « Biomatériaux et inflammation en site osseux », Reims, France 2. Service de pneumologie, CRCM, Hôpital Cochin, Paris, France 3. Service de pneumologie, CRCM, Hôpital Cochin, Paris, France

#### Objectifs

La pathologie osseuse liée à la mucoviscidose (CFBD) est une des nombreuses comorbidités liées à la mutation de CFTR. Une altération du phénotype ostéoclastique a pu être objectivée dans des cultures d'ostéoclastes primaires humains CFTR-F508del et associée à une augmentation de la sphingosine-1-phosphate produite in vitro (Jourdain et al., 2020). La S1P est inversement corrélée à la rigidité osseuse (Weske et al., 2018) et est un marqueur prédictif du risque de fracture chez la femme ménopausée (Ardawi et al., 2018). Nous avons évalué les effets des traitements correcteurs et potentialisateurs de CFTR sur des indicateurs sériques de l'homéostasie osseuse chez des patients F508del.

#### Matériels et méthodes

Des prélèvements sanguins ont été obtenus de patients atteints d'une mutation CFTR-F508del à partir de cohortes de deux CRCM (Reims - NCT04877223 et Paris - NCT03492567) et de sujets contrôles (EFS Grand Est convention ALC/PIL/DIR/AJR/FO/606). A partir du sang total de 41 patients CFTR-F508del et de 41 sujets contrôles, les monocytes circulants précurseurs d'ostéoclastes ont été isolés puis des marquages membranaires des récepteurs RANK et MCSFR ont été réalisés afin d'évaluer, par cytométrie en flux, le pourcentage de cellules positives pour ces récepteurs. Les séras issus de 16 patients CFTR-F508del, de 17 patients CFTR-F508del traités (traitements correcteurs et potentialisateurs du gène CFTR) et de 41 contrôles sains ont permis d'évaluer la concentration sérique de 3 médiateurs d'intérêt (S1P, P1NP, CTX) par ELISA.

#### Résultats

Nous avons mis en évidence une augmentation significative du pourcentage de monocytes circulants RANK+/MCSFR+ chez les patients F508del comparativement aux sujets sains (70% vs 51%;  $p<0.05$ ) sans variation chez les patients traités comparativement aux non traités (78%;  $p>0.05$ ). La mesure de la S1P sérique a montré une augmentation de sa concentration chez les sujets F508del comparativement à la population saine (+120%;  $p<0.05$ ). Des résultats similaires sont observés pour P1NP et CTX, marqueurs du remaniement osseux, dont les concentrations sont augmentées chez les patients F508del comparativement aux sujets sains (respectivement, +121% et +14%;  $p<0.05$ ). Une diminution significative de ces 3 médiateurs est observée chez les patients traités comparativement aux patients non traités ( $p<0.05$ ) avec un retour aux valeurs de la population saine pour S1P et CTX ( $p>0.05$ ). La concentration de P1NP demeure supérieure chez les sujets F508 traités comparativement à la population contrôle ( $p<0.05$ ).

#### Discussion et conclusions

Chez les patients F508del, nous avons mis en évidence une augmentation de la résorption osseuse clinique marquée par une élévation sérique de CTX. Cette augmentation est associée à une population de monocytes circulants RANK+/MCSFR+ plus importante et une plus forte concentration de S1P sérique. Les traitements correcteurs et potentialisateurs de CFTR semblent normaliser la résorption osseuse, mais sans impact sur la population de précurseurs d'ostéoclastes. Aussi, la diminution de la S1P, majoritairement sécrétée par les ostéoclastes (Kim et al., 2020), semble indiquer un impact des traitements non pas sur les cellules précurseurs mais plutôt sur les ostéoclastes différenciés.

#### Références

Ardawi MM, Rouzi AA, Al-Senani NS, Qari MH, Elsamanoudy AZ, Mousa SA. High Plasma Sphingosine 1-phosphate Levels Predict Osteoporotic Fractures in Postmenopausal Women: The Center of Excellence for Osteoporosis Research Study. *J Bone Metab.* 2018;25(2):87-98. doi:10.11005/jbm.2018.25.2.87 Jourdain ML, Sergheraert J, Braux J, Guillaume C, Gangloff SC, Hubert D, Velard F, Jacquot J. Osteoclastogenesis and sphingosine-1-phosphate secretion from human osteoclast precursor monocytes are modulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2021 Mar 1;1867(3):166010. doi: 10.1016/j.bbdis.2020.166010. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33188942. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells.* 2020 Sep 10;9(9):2073.

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : Vertex Incorporation

## LEPISSEIER Agathe

### MECANISMES D'ACTION IMPLIQUES DANS LA REPOSE RESPIRATOIRE AUX MODULATEURS DE CFTR.

A. Lepissier<sup>1</sup>, E. Dreano<sup>1</sup>, A. Hatton<sup>1</sup>, G. Crambert<sup>2</sup>, I. Sermet-Gaudelus<sup>1,3</sup>

1. Institut Necker Enfants Malades 2. CNRS ERL8228, Centre de recherche des Cordeliers 3. APHP, Hôpital Necker Enfants Malades, CRCM

#### Objectifs

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive due aux mutations du gène CFTR. Ce dernier code pour la protéine CFTR, un canal anionique situé à la membrane apicale des cellules épithéliales. CFTR transporte les ions chlorures et bicarbonates dans le liquide de surface des voies respiratoires (ASL). L'hydratation et le pH de l'ASL sont ainsi régulés et participent au maintien de l'homéostasie pulmonaire. La mutation la plus fréquente, F508del, est présente chez 80% des patients dans le monde. Elle est à l'origine d'un défaut de transport des ions chlorure et bicarbonate à la membrane apicale de l'épithélium respiratoire, entraînant une dérégulation du pH. Le développement des modulateurs de CFTR et notamment de la combinaison d'un potentiateur (VX-770) et de deux correcteurs (VX-445/VX-661) ont montré une nette amélioration de la fonction respiratoire chez les patients. Les mécanismes d'action de ces traitements ne sont cependant pas complètement élucidés. Il a récemment été montré que ces traitements corrigent la sécrétion de chlorure médiée par CFTR et qu'ils induisent une alcalinisation de l'ASL en conditions inflammatoires. Dans ce travail nous étudions la correction du transport de bicarbonate médié par CFTR et son effet sur le pH, en conditions inflammatoires ou non.

#### Matériels et méthodes

Des cellules épithéliales bronchiques et nasales ont été prélevées chez des patients homozygotes F508del et cultivées pour construire un modèle in vitro d'épithélium respiratoire en interface air/liquide. Pour étudier l'effet in vitro de la triple combinaison (TRI) et du contrôle (DMSO), les cellules primaires sont traitées pendant 48h. Le transport de chlorure et de bicarbonate est ensuite évalué en courant de court-circuit en chambre de Ussing (World Precision Instruments) par étude de la variation de l'intensité de courant mesurée après ajout des inhibiteurs de CFTR (Inh172 et GlyH101). Le pH de l'ASL est mesuré en atmosphère contrôlée 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Tech Systèmes), à l'aide d'une micro-électrode (Thermo Scientific Orion 9810BN). L'expression des différents transporteurs a été quantifiée par RTqPCR.

#### Résultats

La triple combinaison augmente le transport d'ions chlorures (N=16, p<0,001) et bicarbonates (N=11, p=0,001) dans les cellules épithéliales nasales ainsi que dans les cellules épithéliales bronchiques (Cl<sup>-</sup> N=6, p=0,0313 ; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> N=6, p=0,0313). Les mesures de pH ont montré une alcalinisation de l'ASL médiée par CFTR en Ringer physiologique après stimulation de l'inflammation (p<0,05) ainsi qu'en conditions d'inhibition de la pendrine à l'état basal (N=6, p<0,05) et en conditions inflammatoires (N=6, p<0,05). La transcription de CFTR et de la pendrine est significativement augmentées après stimulation de l'inflammation (p<0,05) mais n'est pas significativement modifiée par le traitement.

#### Discussion et conclusions

Le transport de bicarbonate médié par CFTR est corrigé par la triple combinaison VX-445/661/770 et participe à l'alcalinisation du pH de l'ASL. Ces résultats permettent une meilleure compréhension du mécanisme d'action des modulateurs et de leur activité sur la régulation fine du transport ionique épithélial et du maintien de l'homéostasie pulmonaire.

#### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : APHP

MESINELE Julie

## LUMACAFITOR-IVACAFITOR : FACTEURS IMPLIQUES DANS LA REPONSE AU TRAITEMENT ET IMPACT SUR LA FONCTION RESPIRATOIRE

Julie Mésinèle<sup>1,2</sup>, Manon Ruffin<sup>1</sup>, Loïc Guillot<sup>1</sup>, Pierre-Yves Boëlle<sup>2</sup>, Harriet Corvol<sup>1,3</sup>  
1Sorbonne Université, Inserm UMR S\_938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France; 2Sorbonne Université, Inserm, Institut Pierre Louis d'épidémiologie et de Santé Publique, IPLESP, APHP, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; 3AP-HP, Hôpital Trousseau, Service de Pneumologie Pédiatrique, Paris, France.

### Objectifs

Le traitement lumacaftor-ivacaftor (LUMA-IVA) est indiqué pour les patients atteints de mucoviscidose et homozygotes pour la mutation F508del de CFTR. Il est observé une grande variabilité interindividuelle de la réponse et l'objectif était d'identifier des facteurs cliniques et/ou génétiques modulant la réponse à LUMA-IVA.

### Matériels et méthodes

765 patients de plus de 12 ans et traités par LUMA-IVA ont été inclus. La réponse au traitement a été déterminée par la variation de la fonction respiratoire (mesurée par le VEMS exprimé en pourcentage prédit (VEMSpp) ou en SaKnorm Z-value) et de l'état nutritionnel (évalué par l'IMC Z-score) comparativement aux valeurs pré-traitement. Nous avons évalué la réponse au traitement au cours des deux premières années suivant l'initiation par des modèles d'estimation d'équations généralisées pondérées.

### Résultats

La fonction respiratoire s'est améliorée après 6 mois de traitement, avec une augmentation de SaKnorm Z-value de +0,106 ( $\pm 0,015$ ;  $P < 0,0001$ ), correspondant à une amélioration de +2,11 ( $\pm 7,81$ ) points de VEMSpp. Le déclin annuel de VEMSpp a diminué, passant de -1,86 % (-2,04 ; -1,68) avant le début du traitement par LUMA-IVA à -0,81 % (-1,22 ; -0,40 ;  $P < 0,0001$ ) après. L'état nutritionnel s'est également amélioré après 6 mois de traitement avec une augmentation de l'IMC Z-score de 0,108 ( $\pm 0,017$ ;  $P < 0,0001$ ), correspondant à une augmentation de +0,44 ( $\pm 0,77$ ) kg/m<sup>2</sup>. Les gains ont été maintenus au cours des 2 premières années de traitement et étaient plus importants chez les patients les plus sévères. Bien que les femmes aient un statut nutritionnel pré-traitement inférieur à celui des hommes, leur réponse au traitement était plus importante et les femmes atteignaient des valeurs d'IMC Z-score similaires à celles des hommes après 2 ans de traitement. Aucune association entre les variants des gènes de la famille SLC et la réponse respiratoire n'a été observée, mais le rs12839137 de SLC6A14 était associé à la réponse nutritionnelle.

### Discussion et conclusions

Nous avons identifié des facteurs associés à la réponse au traitement LUMA-IVA et confirmé son impact favorable sur le déclin de la fonction respiratoire et l'état nutritionnel. L'identification des gènes modificateurs est un défi important qui devrait permettre de distinguer les patients susceptibles de répondre différemment aux modulateurs de la CFTR, une étape fondamentale pour une médecine personnalisée dans la mucoviscidose.

### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui  
ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non  
BLANCHE POUR VAINCRE : NON  
AUTRE : Fondation pour la recherche médicale (FRM)

## MITRI Christie

### DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE THERAPEUTIQUE POUR LE TRAITEMENT DE L'ENSEMBLE DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE

Christie Mitri 1, Nathalie Rousselet 1, Harriet Corvol 1,2, Olivier Tabary 1

1. Sorbonne Universités, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris 2. Département de Pédiatrie Respiratoire, Hôpital Trousseau, Paris

#### Objectifs

Il existe encore un besoin clinique non satisfait de thérapies pour les patients atteints de mucoviscidose présentant des mutations non compatibles avec les traitements actuels, tel que les patients de classe I qui constituent 10% mais aussi les patients non répondeurs. Nous avons donc développé un oligonucléotide (ASO TMEM16a) qui a permis d'augmenter l'expression et l'activité chlorure du canal anoctamine 1 (TMEM16a), qui transporte les ions chlorure et qui peut constituer une voie de transport alternative indépendante de CFTR. Dans le cadre de ce projet, nous voulons étudier les effets de cette molécule sur l'ensemble des paramètres dérégulés dans la mucoviscidose et montrer qu'elle pourrait être potentiellement efficace à l'ensemble des patients. Nous avons étudié les effets de la potentialisation de TMEM16a in vitro et in vivo et préparé les études précliniques en évaluant la meilleure voie d'administration, la toxicité et la spécificité de l'ASO TMEM16a. Des études sur la survie et la fertilité chez les souris CF ont également été menées.

#### Matériels et méthodes

Les expériences sont réalisées sur des lignées cellulaires et des cellules primaires avec différentes mutations. Le modèle murin CF est utilisé pour étudier les différentes voies d'administration, compléter les données de survie et étudier les effets à long terme.

#### Résultats

L'oligonucléotide potentialise l'activité de TMEM16a et augmente l'efflux de chlorure dans les cellules CFBE41o- et la clairance mucociliaire dans les cellules épithéliales bronchiques (hBEC) de patients atteints de mucoviscidose porteurs de différentes mutations. L'ASO TMEM16a est détectable 30 jours après injection sous-cutanée chez les souris CF et augmente significativement la durée de vie des souris. L'administration aiguë de 50 fois la dose efficace n'a pas montré de changements comportementaux ni de changements macroscopiques ou anatomopathologiques. L'ASO TMEM16a est très spécifique, n'induit pas d'inflammation et n'altère pas la mobilisation du calcium intracellulaire ou la prolifération cellulaire. Nos résultats préliminaires montrent une amélioration de la fertilité des souris CF mâles en restaurant les anomalies du canal déférent, également décrites chez les patients mâles atteints de mucoviscidose.

#### Discussion et conclusions

La molécule est spécifique au TMEM16a 3'UTR et agit comme un correcteur pour augmenter l'expression au niveau de la membrane apicale. Cette stratégie pourrait s'appliquer à tous les patients, seule, ou en combinaison avec les molécules Vertex. Actuellement, nous nous attachons à étudier les effets de cette molécule sur les cellules de patients et les souris porteurs de mutations de classe I.

#### Références

Non communiquées

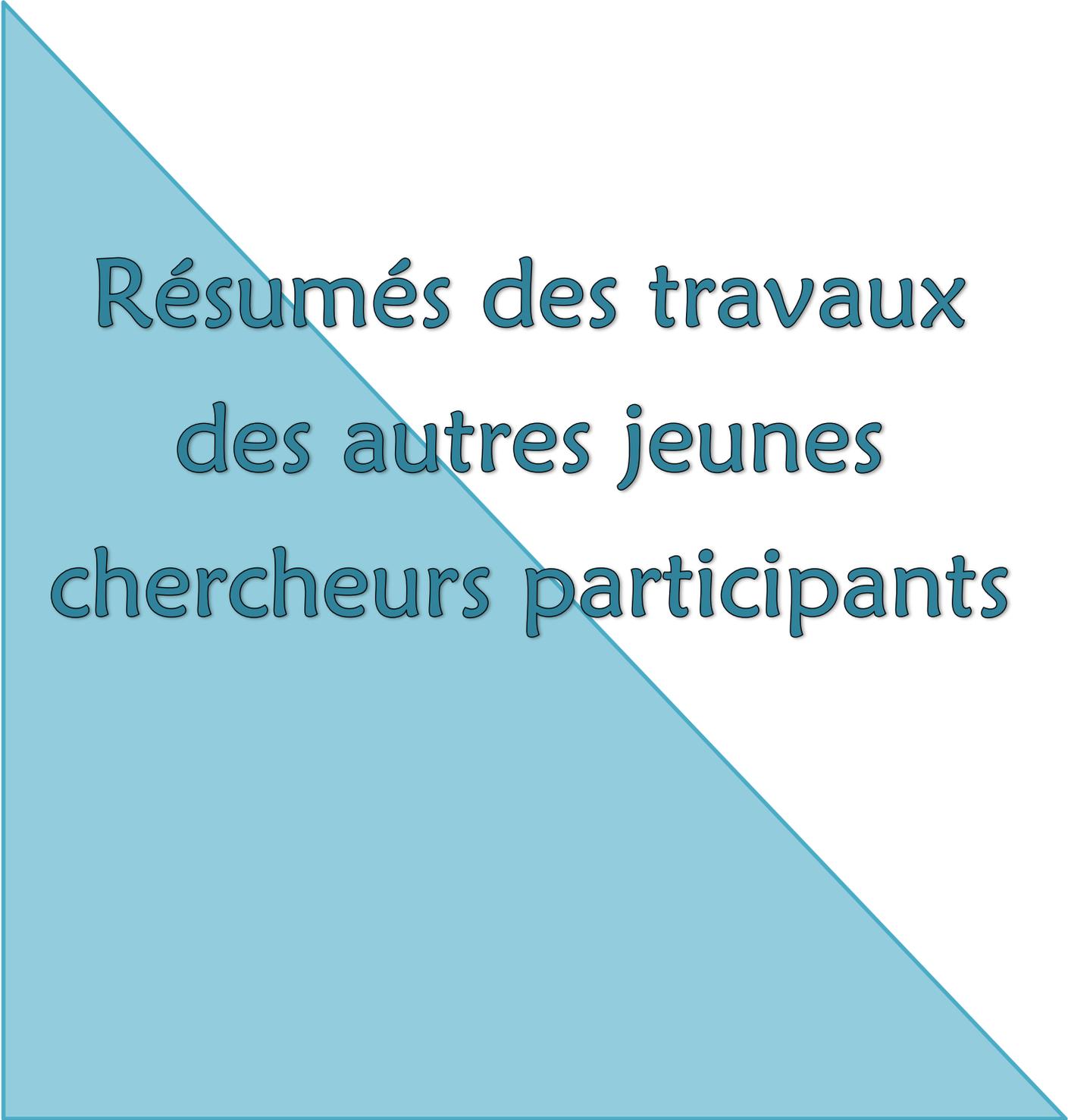
#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : OUI

AUTRE : SATT Lutech, Inserm Transfert



Résumés des travaux  
des autres jeunes  
chercheurs participants

## Sommaire

|                   |              |   |    |
|-------------------|--------------|---|----|
| <b>BIGOT</b>      | Jeanne       | <i>Identification des récepteurs cellulaires et des ligands fongiques impliqués dans la synthèse d'IL-8 des cellules épithéliales bronchiques infectées par <i>Aspergillus fumigatus</i>.</i>             | 25 |
| <b>BLOTAS</b>     | Clara        | <i>Etude d'éléments cis-régulateurs du gène CFTR</i>  | 26 |
| <b>BOSC</b>       | Lola         | <i>Caractérisation fonctionnelle de la voie Pseudopaline chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i></i>   | 27 |
| <b>BOUTE</b>      | Mélodie      | <i>Utilisation de molécules inhibant l'élastase (LasB) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in vitro et in vivo chez la souris : application pour la mucoviscidose.</i>                                       | 28 |
| <b>BRAX</b>       | Sylvain      | <i>Rôle des septines dans l'infection bronchique à <i>P. aeruginosa</i> dans le contexte de la mucoviscidose</i>  | 29 |
| <b>CHOTTIN*</b>   | Claire       | <i>Immunomodulation de la sensibilité néonatale au Virus Respiratoire Syncytial par des bactéries primo-colonisatrices du poumon</i>  | 30 |
| <b>DUPUIS</b>     | Gabrielle    | <i>Étude du rôle du facteur de virulence ExoY de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans la réponse des cellules pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose</i>  | 31 |
| <b>DUPUIS</b>     | Lucas        | <i>Résistance de <i>Pseudomonas</i> à la phagocytose : rôle du système Tat dans la tolérance au cuivre</i>  | 32 |
| <b>GERGES</b>     | Elias        | <i>Caractérisation du rôle de la protéine Lsr2 dans la virulence des morphotypes lisses et rugueux de <i>Mycobacterium abscessus</i>.</i>   | 33 |
| <b>HAJJAR*</b>    | Helene       | <i>Etude de l'infection persistante chez l'embryon de poisson-zèbre infecté par <i>Pseudomonas aeruginosa</i></i>   | 34 |
| <b>ILLOUZ</b>     | Morgane      | <i>Rôle des glycopeptidolipides dans la spécificité des interactions entre mycobactériophages et <i>Mycobacterium abscessus</i></i>   | 35 |
| <b>JOUAULT</b>    | Albane       | <i>Cg-BigDef1, un bon candidat pour traiter les infections à <i>Staphylococcus aureus</i> ?</i>   | 36 |
| <b>LAGUNE</b>     | Marion       | <i>Les protéines sécrétées par le système ESX-4 de <i>Mycobacterium abscessus</i> (Mabs) : leur immunogénicité et leur rôle</i>   | 37 |
| <b>LEFEBVRE</b>   | Delphine     | <i>Caractérisation d'une nouvelle phospholipase antibactérienne de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></i>  | 38 |
| <b>LEVEQUE</b>    | Manuella     | <i>Correction de F508del-CFTR par Elexacaftor/Ivacaftor/Tezacaftor : description pharmacologique et mécanisme d'action</i>  | 39 |
| <b>NAJM</b>       | Matthieu     | <i>Identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour la mucoviscidose par des approches de biologie des systèmes</i>   | 40 |
| <b>SIMONNEAU*</b> | Benjamin     | <i>Modulation pharmacologique de COMMD1 : effet stabilisateur de CFTR-F508del dans le contexte de la mucoviscidose ?</i>  | 41 |
| <b>SORLIN</b>     | Pauline      | <i><i>Achromobacter xylosoxidans</i> possède-il des caractéristiques spécifiques qui pourraient contribuer à son émergence au cours de la mucoviscidose ?</i>   | 42 |
| <b>SY</b>         | Khadeeja     | <i>Rôle des médiateurs lipidiques de la résolution de l'inflammation dans l'interaction entre biofilm polymicrobien et cellules épithéliales bronchiques issues de patients atteints de mucoviscidose</i> | 43 |
| <b>TAREAU</b>     | Anne-Sophie  | <i>Nouvelles stratégies de lutte contre les pathogènes opportunistes de l'Homme, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i></i>  | 44 |
| <b>TIDJANI</b>    | Abdoul-Razak | <i>Rôle des polyamines dans la virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> au cours de l'infection pulmonaire chronique chez les patients CF</i>   | 45 |
| <b>VALDÉS*</b>    | Loréna       | <i>Variations de méthylation de l'ADN dans des gènes de la voie JAK/STAT chez des patients atteints de mucoviscidose</i>  | 46 |

\*ce résumé est accompagné d'une diapositive complémentaire

**BIGOT Jeanne**

## **IDENTIFICATION DES RECEPTEURS CELLULAIRES ET DES LIGANDS FONGIQUES IMPLIQUES DANS LA SYNTHÈSE D'IL-8 DES CELLULES ÉPITHÉLIALES BRONCHIQUES INFECTÉES PAR ASPERGILLUS FUMIGATUS.**

E. Poucet<sup>1</sup>, A. Moreau<sup>2</sup>, L. Marti<sup>1</sup>, N. Richard<sup>2</sup>, T. Fontaine<sup>3</sup>, H. Corvol<sup>2</sup>, V. Balloy<sup>1</sup>, J. Bigot<sup>4</sup>

1. Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, 2. Pneumologie Pédiatrique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Trousseau, Paris, 3. Unité Biologie et pathogénicité fongiques, Institut Pasteur, Paris, 4. Service de Parasitologie-Mycoologie, Hôpital St Antoine, Paris.

### **Objectifs**

*Aspergillus fumigatus* (Af) est un champignon présent dans l'air sous forme de spores dormantes. Au cours de sa croissance, Af présente différents morphotypes. La germination de la spore qui commence par son gonflement avant le développement d'un filament appelé aussi hyphes. Ce sont les spores qui pénètrent dans les voies aériennes au cours du cycle respiratoire mais sont rapidement éliminées par la clairance muco-ciliaire. Lors de défaut de cette clairance, comme chez les patients souffrant de mucoviscidose (CF), les spores peuvent persister dans les voies aériennes et causer différentes manifestations cliniques entraînant une détérioration de la fonction respiratoire. Les premières cellules du tractus respiratoires inférieures à entrer en contact avec les spores sont les cellules épithéliales bronchiques (CEB), ligne de défense innée contre les pathogènes aéroportés. Dans une étude précédente, nous avons montré que seul le contact des CEB avec des filaments d'Af induisait la production d'une chimiokine pro inflammatoire, l'IL-8. Cependant, les récepteurs de surface des CEB impliqués dans la reconnaissance d'Af ainsi que les partenaires fongiques restent encore inconnus. L'analyse transcriptomique de CEB infectées par Af nous a permis d'identifier un récepteur, ephrin type-A récepteur 2 (EphA2), dont l'expression est augmentée lorsque le champignon est sous forme de filaments. Nos objectifs sont d'étudier le rôle de EphA2 dans l'interaction des CEB avec Af, d'identifier d'éventuels co-récepteurs cellulaires impliqués ainsi que les partenaires fongiques interagissant avec ces récepteurs.

### **Matériels et méthodes**

Pour étudier l'implication d'EphA2, les CEB (lignée BEAS-2B) ont été transfectées avec des siARN d'EphA2, puis infectées par Af (souche DAL, MOI 0,001) pendant 15 heures. Les surnageants cellulaires ont été recueillis afin de mesurer la synthèse d'IL-8, reflétant la réponse inflammatoire des cellules. Par ailleurs, les protéines des cellules infectées par Af pendant 4, 6 et 8 h ont été extraites afin d'étudier l'activation de EphA2 par western blot (EphA2 phosphorylé/EphA2 total). Dans le but d'identifier les composants fongiques impliqués dans l'induction de la synthèse d'IL-8, les CEB ont été stimulées pendant 15 heures par une gamme de concentrations de lipogalactomannane d'Af purifié par le Dr T. Fontaine (Institut Pasteur).

### **Résultats**

L'étude du rôle d'EphA2 nous a permis de montrer que cette protéine était impliquée dans la réponse inflammatoire des CEB infectées par Af. De plus, nous avons aussi observé qu'EphA2 était activé après 8h d'infection par Af et donc par les filaments. Nous n'avons pas mesuré de synthèse d'IL-8 par les CEB stimulées avec le lipogalactomannane.

### **Discussion et conclusions**

L'ensemble de ces données va nous permettre d'avoir une vue plus précise de l'interaction des CEB avec Af et de comprendre comment elles contribuent au développement de la réponse immunitaire contre ce champignon.

### **Références**

Non communiquées

#### **FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## BLOTAS Clara

### ETUDE D'ÉLÉMENTS CIS-REGULATEURS DU GÈNE CFTR

Clara Blotas<sup>1</sup>, Mégane Collobert<sup>1</sup>, Ozvan Bocher<sup>1</sup>, Anaïs Le Nabec<sup>1</sup>, Emmanuelle Génin<sup>2</sup>, Claude Férec<sup>1,3</sup> et Stéphanie Moisan<sup>1,3</sup>

1. Univ Brest, Inserm, EFS, UMR 1078, GGB, F-29200 Brest, France 2. Inserm, Univ Brest, EFS, UMR 1078, GGB, F-29200 Brest, France 3.

Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, CHRU Brest, Bretagne, France

#### Objectifs

La mucoviscidose est une maladie génétique fréquente dans la population caucasienne ayant suscité de nombreux travaux de recherche. Bien que le diagnostic des patients a très largement évolué grâce à l'identification de nombreuses mutations dans le gène CFTR, pour certains patients atteints de mucoviscidose ou de formes frontières la corrélation entre le phénotype et le génotype reste non résolue. Pour pallier à cela, ce projet a pour but de mettre en évidence des éléments cis-régulateurs (CREs) pouvant expliquer le phénotype de cas non résolus. En effet, une altération de la régulation de gènes peut provoquer des pathologies, on parle d' « enhanceropathies ».

#### Matériels et méthodes

Afin d'étudier la régulation du gène CFTR, des tests d'activité par gène rapporteur et d'immunoprécipitation de la chromatine dans des cellules intestinales (Caco-2) ont permis de caractériser ces CREs. Pour valider leurs fonctions endogènes, des tests d'inactivation avec CRISPR/dCas9 sont développés. Ensuite, les interactions chromatiniennes (boucles d'ADN) sont confirmées en utilisant des techniques d'étude de la chromatine (4C). Une deuxième partie est consacrée à la détection de variants au sein des CREs par séquençage NGS du locus CFTR chez des patients atteints de CFTR-RD.

#### Résultats

Un outil de prédiction bioinformatique (score GWAS3D) a identifié quatre introns considérés comme importants dans la régulation du CFTR. Les introns 1 (185 + 10 kb), 12 (1811 + 0,8 kb) ont déjà été décrits comme des CREs dans les cellules intestinales mais les introns 24 (4095 + 7,2 kb) et 26 (4374 + 1,3 kb) ont été nouvellement identifiés. Ces deux CREs ont une importante activité enhancer coopérative, selon les tests d'activité. Les analyses de fixation des facteurs de transcription (FTs) par immunoprécipitation de la chromatine ont démontré l'enrichissement des FTs HNF1a, p300, FOXA1/2, et CDX2 sur les enhancers des introns 24 et 26. Ces résultats nous ont permis de proposer un nouveau modèle tridimensionnel de la régulation du gène CFTR au sein du locus. En séquençant des patients atteints d'Agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD), huit variants régulateurs potentiels ont été mis en évidence en raison de leur fréquence par rapport à la population européenne. Pour comprendre leur impact sur la régulation tridimensionnelle du locus CFTR, des tests fonctionnels sont réalisés. Des tests d'activité montrent que les variants dans les introns 1, 12 et 24 conduisent à une diminution de l'expression du gène CFTR et perturbent les activités enhancer coopératives. Ceci peut être expliqué par la présence de motifs de fixation des FTs sur ces régions.

#### Discussion et conclusions

Ainsi ces travaux permettent de mieux comprendre l'organisation tridimensionnelle du locus CFTR afin d'améliorer la prise en charge des patients.

#### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : Bourse école doctorale

## BOSC Lola

### CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA VOIE PSEUDOPALINE CHEZ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

L. Bosc<sup>1</sup>, G. Ball<sup>1</sup>, M. Tribout<sup>1</sup>, L. Ouerdane<sup>2</sup>, P. Arnoux<sup>3</sup>, R. Voulhoux<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> CNRS/AMU – LCB – UMR7283, Marseille, France <sup>2</sup> CNRS/Université de Pau – UMR5254, Pau, France <sup>3</sup> CEA/CNRS/AMU – UMR7265, CEA Cadarache, St-Paul-lez-Durance, France

#### Objectifs

*Pseudomonas aeruginosa* (P.a.) est une bactérie pathogène opportuniste infectant jusqu'à 70% des patients atteints de mucoviscidose. Afin de contrer l'immunité nutritionnelle imposée par l'hôte, les bactéries sécrètent des métallophores, petites molécules à forte affinité pour les métaux. P.a. répond à une carence en Zn en sécrétant la pseudopaline (Pp), capable de capter et d'importer le Zn nécessaire à sa croissance. La voie Pp (ou Cnt) est exprimée lors de l'infection (1,2) et nécessaire à la croissance de P.a. dans le mucus des voies respiratoires (3). Alors que les étapes de synthèse, export et import de la voie Pp ont été décrites (4,5), le mécanisme permettant la libération du métal est encore inconnu. Le gène PA14\_63970, co-localisé avec l'opéron cntOLMI code pour une acétyltransférase membranaire possiblement impliquée dans ce processus. L'objectif de cette étude est donc de déterminer l'implication et le rôle de cette protéine dans la voie Pp.

#### Matériels et méthodes

Conditions de culture : Milieu minium MS (minimal succinate media) supplémenté en EDTA 100µM (MCM, minimal chelated media) afin d'induire la voie Pp. Expression de cntO et PA14\_63970 : Culture de PA14 et PA14::zur en MCM ou LB. Quantification de l'expression des deux gènes par qRT-PCR. Formation de biofilm : Inoculation à DO 0.2 en MCM et incubation 24h à 30°C. Coloration des biofilms au crystal violet et dosage à 550 nm. Mobilité Swarming : 5µL à DO 0.2 de cultures en LB sont déposés sur boîtes MS Agar 0.5% incubées à 37°C sur la nuit puis 24h à température ambiante. Dosage de métaux: Culture en MCM 10h à 37°C. Après lavages, séchage des culots à 95°C puis détermination des niveaux de métaux intracellulaires par ICP-MS.

#### Résultats

L'étude des régions promotrices de cntO et PA14\_63970 a révélé la présence d'une « Zur-box » commune, suggérant leur co-régulation par le niveau de Zn via la protéine Zur. L'analyse de leur expression montre que similairement à cntO, PA14\_63970 est exprimé en MCM de manière Zur-dépendante. Le mutant de délétion PA14Δ63970 construit montre des défauts de formation de biofilm et de motilité de type swarming, deux phénotypes retrouvés en absence de Pp dans la souche PA14ΔcntL, suggérant son implication dans la voie. L'analyse du niveau de Zn intracellulaire montre que l'absence de PA14\_63970 n'induit pas de défaut d'import de ce métal. Ainsi, si PA14\_63970 est effectivement impliquée dans la voie Pp, elle devrait exercer son effet après l'import de Pp par CntO, en accord avec notre hypothèse de modification du métallophore une fois l'holo-Pp importée.

#### Discussion et conclusions

Nos résultats vont dans le sens d'un rôle de PA14\_63970 dans la voie Pp post-import par CntO. Afin de valider l'hypothèse du rôle de PA14\_63970 dans la libération du métal, la perte de démétallation de la Pp après incubation avec des lysats de PA14Δ63970 sera étudiée par spectrométrie de masse. L'activité acétyltransférase de cette protéine membranaire et son action sur la Pp sera confirmée par reconstitution de cette activité en liposomes. L'import de Zn par la Pp étant essentiel lors d'infection, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de cette voie pourrait ouvrir au développement de nouvelles molécules inhibitrices contre P.a.

#### Références

- Palmer et al. (2005) J. Bacteriol.
- Bielecki et al. (2011) PLoS ONE
- Gi et al. (2015) Sci. Rep.
- Lhospice et al. (2017) Sci. Rep.
- Gomez et al. (2021) Mol. Microbiol.

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non  
 ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non  
 BLANCHE POUR VAINCRE : NON  
 AUTRE : ANR

## BOUTE Mélodie

### UTILISATION DE MOLECULES INHIBANT L'ELASTASE (LASB) DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN VITRO ET IN VIVO CHEZ LA SOURIS : APPLICATION POUR LA MUCOVISCIDOSE.

Mélodie Bouté<sup>1</sup>, Bérengère Villeret<sup>1</sup>, Maëlys Born-Bony<sup>1</sup>, Ignacio Garcia-Verdugo<sup>1</sup>, Jörg Haupenthal<sup>2</sup>, Anna KH Hirsch<sup>2,3</sup>, et Jean-Michel Sallenave<sup>1</sup>

1 : UMR1152 « Physiopathologie et Epidémiologie des Maladies Respiratoires », Equipe : « Immunité Innée et défenses pulmonaires anti-infectieuses », Université de Paris ,75018 Paris, FRANCE 2: Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland (HIPS), Helmholtz Centre for Infection Research (HZI), Campus E8.1, 66123 Saarbrücken, Germany 3: Department of Pharmacy, Saarland University, Campus E8.1, 66123 Saarbrücken, Germany

#### Objectifs

Traiter les infections récurrentes à *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) chez les patients mucoviscidose, en identifiant, par une approche pharmacologique, un ou des inhibiteur(s) capable(s) de cibler l'élastase (LasB), un facteur majeur de virulence de ce pathogène (1) (2).

#### Matériels et méthodes

Les inhibiteurs étudiés dans ce projet ont été générés à l'Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland (HIPS). Ils ont un poids moléculaire compris entre 300 et 500 Daltons, et comportent un groupement phosphonate capable de lier le zinc. 1)

In vitro : L'activité de ces inhibiteurs a été testée en les co-incubant avec des sécrétomes de P.a sur des cellules bronchiques (human Airway Epithelial Cells, Cystic Fibrosis patients (hAEC CF)), ou alvéolaires (A549). Du sécrétome à 5% et les inhibiteurs de LasB à 2, 0.5, 0.1 et 0.05 $\mu$ M, ont été préparés en milieu F12K seul, puis déposés sur les cellules A549, pendant 24 heures. Pour les cellules hAEC, du sécrétome à 10% et les inhibiteurs à 1, 0.5 et 0.1 $\mu$ M ont été préparés en milieu hAEC seul (hAEC Culture Medium), et déposés durant 72h, sur les cellules. Ensuite, le décollement cellulaire a été évalué dans les A549 et les hAEC. 2)

In vivo : La protéine purifiée de LasB (Nagase ChemteX Corp, Japon) a été incubée avec les inhibiteurs de LasB pendant 1 heure à 37°C, avant instillation intra-nasale à des mâles C57Bl/6. Les souris ont reçu 70 $\mu$ M (40 $\mu$ g) de protéine purifiée de LasB et 700 $\mu$ M d'inhibiteurs. L'état clinique, le poids et la survie des souris ont été observés.

#### Résultats

1) In vitro : inhibition de l'activité cytotoxique des sécrétomes de P.a par les inhibiteurs de LasB. Suite au dépôt du sécrétome de P.a, l'ID50 de chaque inhibiteur a été évalué pour mesurer l'activité cytotoxique cellulaire. Pour les A549, cet ID50 est compris entre 1.5 $\mu$ M et 0.01 $\mu$ M, et pour les hAEC, l'ID50 varie de 0.95 $\mu$ M à 0.2 $\mu$ M. 2) In vivo : effet protecteur des inhibiteurs de LasB. Dans les 48 heures qui ont suivis la co-instillation LasB-inhibiteurs, seules les souris instillées avec LasB montrent une diminution de leur poids (15%). Sept jours post-instillation, le taux de mortalité le plus élevé (66%) est observé dans le groupe ayant reçu LasB seul. De façon intéressante, certains inhibiteurs ont montré une protection complète contre la mortalité.

#### Discussion et conclusions

Bien que ces résultats soient préliminaires, certains inhibiteurs de LasB semblent jouer un rôle protecteur, in vivo, lors de la co-administration LasB-inhibiteurs. Ces résultats prometteurs devront être confirmés dans un modèle d'infection pulmonaire à P.a in vitro et in vivo.

#### Références

(1) Saint-Criq V et al, Thorax. janv 2018;73(1):49-61. (2) Bastaert F et al, Front Immunol. 2018;9:1675

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : Bill and Melinda Gates Foundation Financement Carb-X (EU, Boston)

**BRAX Sylvain**

## **ROLE DES SEPTINES DANS L'INFECTION BRONCHIQUE A P. AERUGINOSA DANS LE CONTEXTE DE LA MUCOVISCIDOSE**

S. Brax(1), C. Calmel(1), H. Corvol(1), M. Ruffin(1), L. Guillot(1)

(1)Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint Antoine (CRSA), Mucoviscidose : Physiopathologie et Phénoméno-mique, Paris.

### **Objectifs**

La mucoviscidose ou CF (pour « Cystic Fibrosis ») est causée par des mutations du gène CFTR. Les cellules épithéliales bronchiques forment une barrière physique contre les microorganismes pathogènes et orchestrent la réponse immunitaire innée permettant leur élimination. Toutefois, la mutation du canal CFTR entraîne, au niveau bronchique, une altération de la clairance mucociliaire, le processus d'élimination des particules et pathogènes inhalés. Cette altération favorise la colonisation des bronches par de nombreux pathogènes et l'instauration d'une réponse inflammatoire exacerbée. Les traitements antibiotiques utilisés pour lutter contre les infections, notamment à *Pseudomonas aeruginosa*, favorisent l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques et ainsi la colonisation chronique des patients. Dans ce contexte notre étude vise à étudier les septines (SEPT) comme nouveaux acteurs moléculaires de la physiopathologie de l'infection(1) pour développer des stratégies complémentaires aux traitements antibiotiques.

### **Matériels et méthodes**

Nous avons sélectionné trois SEPT d'intérêt (parmi les 13 existantes) pour notre étude ; la SEPT2, impliquée dans le maintien de la perméabilité de l'épithélium bronchique vis-à-vis de particules fines(2) et les SEPT6 et 7 capables de piéger des bactéries telles que *P. aeruginosa* dans des structures en forme de cages favorisant leur dégradation par le lysosome dans des cellules HeLa(3). Des cellules épithéliales bronchiques primaires différenciées à l'interface air-liquide CF et non CF ainsi que deux lignées cellulaires bronchiques, les Calu-3 wild type (WT)-CFTR/Calu-3-knock down (KD)-CFTR et les BEAS-2B ont été utilisées. La souche de *P. aeruginosa* PAK fluorescente (PAK-GFP) a été utilisée.

### **Résultats**

Nos travaux préliminaires réalisés sur les cellules de lignée Calu-3-WT-CFTR et Calu-3-KD-CFTR montrent une expression (ARN et protéine) diminuée de la SEPT7 dans les cellules KD-CFTR par rapport aux cellules WT. La microscopie optique classique et confocale nous a permis de déterminer la localisation des SEPT d'intérêt dans nos modèles. Nous avons ainsi observé la SEPT2 au niveau des cils et la SEPT7 agencée en filaments dans le cytoplasme des cellules épithéliales bronchiques primaires. L'infection des cellules par PAK-GFP nous a permis d'observer la formation de cages de SEPT7 autour de *P. aeruginosa* dans le cytoplasme des cellules épithéliales bronchiques primaires CF et des BEAS-2B. Afin d'aller plus loin dans l'étude fonctionnelle des SEPT, nous avons également mis au point l'utilisation d'un ARN interférent (ou siARN) ciblant la SEPT7 et permettant d'inhiber son expression.

### **Discussion et conclusions**

Nous avons ainsi mis en évidence l'implication de la SEPT7 dans le processus de reconnaissance et de piégeage de bactéries *P. aeruginosa* intracellulaires dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques CF. La suite de l'étude visera à mieux comprendre le rôle joué par les SEPT dans la réponse anti-infectieuse (cellules CF par rapport cellules non-CF) et dans la régulation de paramètres qui sont liés à cette réponse : l'intégrité épithéliale et la réponse inflammatoire. Cette étude nous permettra de mieux comprendre l'implication des SEPT dans l'infection à *P. aeruginosa* qui survient chez les patients CF.

### **Références**

(1)Ivanov et al., Am J Pathol, 2020. ; (2)Sidhay et al., Am J Respir Cell Mol Biol, 2011 ; (3)Krokowski et al., Cell Host Microbe, 2018.

#### **FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

CHOTTIN Claire

## IMMUNOMODULATION DE LA SENSIBILITE NEONATALE AU VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL PAR DES BACTERIES PRIMO-COLONISATRICES DU POUMON

C Chottin (1)\*, Q Marquant (1)\*, V Saint-Criq (2), D Laubretton (1), C Drajac (1), E Bouguyon (1), A Remot (3), S Riffault (1), M Thomas (2), D Descamps (1)

(1) Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, Jouy-en-Josas, France (2) Université Paris-Saclay, INRAE, Micalis, Jouy-en-Josas, France (3) Université de Tours, INRAE, ISP, Nouzilly, France

### Objectifs

La bronchiolite est la principale infection respiratoire chez le nourrisson, et est causée par le virus respiratoire syncytial (VRS) contre lequel il n'existe pas de vaccins. Cette sensibilité du nourrisson est intrinsèquement liée aux caractéristiques de la muqueuse pulmonaire en période néonatale qui est associée à la mise en place de l'immunité et de la colonisation du poumon par un microbiote bactérien. Notre hypothèse est que les bactéries commensales primo-colonisatrices, qui sont les premiers micro-organismes à « conquérir » le tractus respiratoire, participeraient à la maturation de l'immunité de la muqueuse pulmonaire, et donc à la sensibilité du nouveau-né à des pathologies pulmonaires. La manipulation de ces souches permettrait d'orienter la réponse immunitaire vers une immunité protectrice contre l'infection VRS. Notre projet vise à faire la preuve de concept qu'il est possible par l'utilisation de souches primo-colonisatrices de la flore commensale du poumon de limiter la sévérité de l'infection par le VRS en période néonatale.

### Matériels et méthodes

-Criblage des souches isolées de poumons de souriceaux pour leur capacité immunostimulante et d'interférence avec la réplication du VRS à partir de cultures d'explants de poumons de souriceaux. -Validation de l'effet anti-VRS sur des cultures primaires humaines en interface Air-Liquide (ALI, MucilAir, Epithelix).

### Résultats

Vingt-cinq souches primo-colonisatrices ont été caractérisées sur des explants de poumons de souriceaux par la nature des cytokines sécrétées et par leur effet sur la réplication du VRS. Ainsi, nous avons identifié plusieurs bactéries non cytotoxiques pour le tissu pulmonaire avec la capacité de faire sécréter, par les explants, des cytokines d'immunité de type 1 (Interleukine-12, IFN $\gamma$ ) et/ou à interférer avec la réplication virale. La bactérie 17 a été sélectionnée pour avoir généré une signature cytokinique originale (immunité de type 1 et interleukine-9) et pour son effet. L'effet inhibiteur de cette souche sur la réplication du VRS-Cherry a ensuite été confirmé sur des cultures primaires de cellules épithéliales humaines en ALI pré-exposées à la bactérie 17.

### Discussion et conclusions

La bactérie 17 exerce une action anti-VRS ex vivo sur des explants pulmonaires et des cellules épithéliales humaines. Cette bactérie candidate sera administrée de façon préventive dans un modèle d'infection par le VRS chez le souriceau. Nous établirons si cette souche primo-colonisatrice du poumon réduit la sévérité de l'infection VRS in vivo et constitue un probiotique au potentiel thérapeutique anti-bronchiolite.

### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

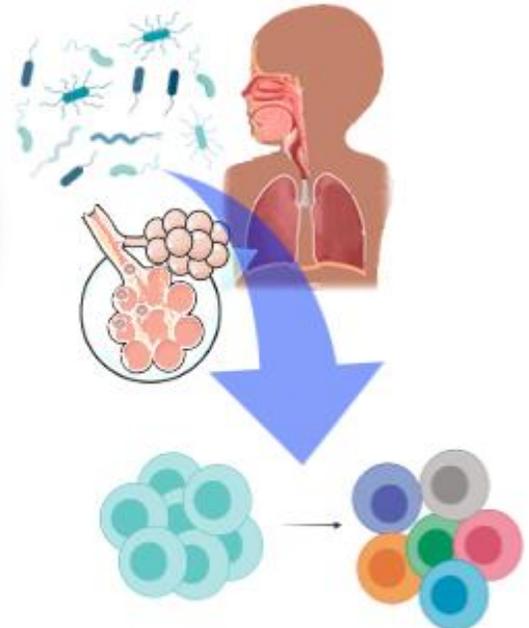
ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

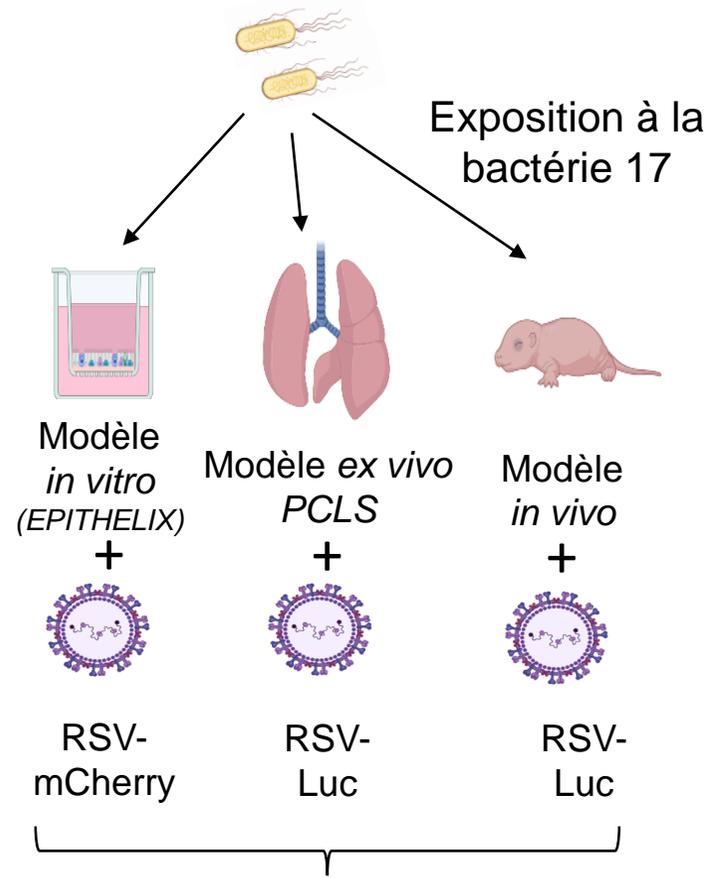
AUTRE :

# Immunomodulation de la sensibilité néonatale au virus respiratoire syncytial par des bactéries primo-colonisatrices du poumons

Les bactéries commensales primo-colonisatrices du tractus respiratoire...



...participeraient à la maturation du système immunitaire de la muqueuse pulmonaire



Diminution de la réplication virale

➔ **Souches d'intérêt à action anti-bronchiolite ?**

Claire Chottin



DUPUIS Gabrielle

## ÉTUDE DU RÔLE DU FACTEUR DE VIRULENCE EXOY DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA DANS LA REPONSE DES CELLULES PULMONAIRES DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE

G. Dupuis<sup>1</sup>, L. Marti<sup>2</sup>, L. Touqui<sup>1,2</sup>, U. Mechold<sup>3</sup>, O. Tabary<sup>1</sup>

1. Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Mucoviscidose : Physiopathologie et PhénoGénomique, Paris, FR  
2. Mucoviscidose et Bronchopathies Chroniques, Département Santé Globale, Institut Pasteur, Paris, FR 3. Unité de Biochimie des Interactions Macromoléculaires, Département de Biologie Structurale et Chimie, CNRS UMR 3528, Institut Pasteur, Paris, FR

### Objectifs

*P. aeruginosa* est une bactérie Gram négatif, ubiquitaire et opportuniste chez l'Homme et ainsi fortement pathogène pour les patients immunodéprimés ou fragilisés, comme les patients atteints de mucoviscidose (patients CF). *P. aeruginosa* est ainsi responsable d'infections respiratoires chroniques chez ces patients et est retrouvée chez plus de 55% des patients CF adultes. De plus, il a été montré que sa présence de façon chronique, est corrélée à leur survie. Parmi ses facteurs de virulence, le système de sécrétion de type III (T3SS) de *P. aeruginosa* joue un rôle majeur dans l'infection. Cet appendice en forme de seringue permet à la bactérie d'injecter des exotoxines directement dans le cytoplasme des cellules cibles. Au nombre de 4 (ExoS, ExoT, ExoU et ExoY), ces exotoxines vont induire des modifications importantes dans le fonctionnement des cellules cibles. Parmi elles, ExoY est exprimée par 90% des souches de *P. aeruginosa* issues de patients CF et non-CF. C'est une nucléotidyl cyclase activée par une liaison à l'actine filamenteuse (F-actine), qui va induire l'accumulation de nucléotides monophosphate cycliques (cNMP) dans le cytoplasme des cellules hôtes. A ce jour, ExoY a été la moins étudiée et de ce fait son rôle dans la virulence de *P. aeruginosa* n'a pas encore été clairement élucidé. De plus, il n'existe aucune donnée sur son rôle dans la pathogenèse de la mucoviscidose. Ce projet a pour but d'étudier le rôle d'ExoY et son implication dans la virulence de *P. aeruginosa* dans un contexte non-CF et CF.

### Matériels et méthodes

Des lignées de cellules épithéliales bronchiques non-CF (NCI-H292, 16HBE14o-) et CF (16HBE41o-F508del) ont été infectées avec une souche de laboratoire de *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1-WT), une souche PAO1 délétée pour ExoY (PAO1ΔY) ou avec ExoY catalytiquement inactif (PAO1ExoYK81M/K88I). La toxicité et l'apoptose ont été étudiées par microscopie, dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) et par Western-Blot (clivage de la caspase-3) respectivement.

### Résultats

Nous avons observé que la souche délétée pour Exo Y (PAO1ΔY) est plus toxique que la souche sauvage. De plus, la souche PAO1ΔY induit une apoptose beaucoup plus importante que la souche PAO1-WT, et la modulation de cette réponse implique les voies ERK et JNK.

### Discussion et conclusions

Nous avons mis en évidence qu'ExoY à un rôle important dans la virulence de *P. aeruginosa* sur les cellules respiratoires CF et non-CF. Par la suite, nous analyserons les effets de ExoY sur d'autres paramètres dérégulés dans la mucoviscidose tels que l'inflammation (cytokines et eicosanoïdes) ainsi que la réparation. Nous identifierons l'ensemble des voies moléculaires modulées par ExoY par séquençage haut débit et validerons nos différents résultats dans un modèle de cellules primaires mais également dans un modèle murin.

### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : Air Liquide

DUPUIS Lucas

## RESISTANCE DE PSEUDOMONAS A LA PHAGOCYTOSE : ROLE DU SYSTEME TAT DANS LA TOLERANCE AU CUIVRE

Lucas Dupuis, Maxime Rémi Gimenez(1), Sophie Bleves(1), Marianne Ilbert(2), Bérengère Ize(1)

(1)Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille (2)Bioénergétique et Ingénierie des Protéines Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille

### Objectifs

Le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* peut être la cause d'infections aiguës ou chroniques en utilisant tout un arsenal de systèmes permettant sa virulence. Parmi ces nombreux mécanismes, l'équipe « Pathogénie chez *Pseudomonas aeruginosa* » s'intéresse aux systèmes de sécrétion et à leurs effecteurs. Le système Tat, permettant l'export de protéines substrats du cytoplasme vers le périplasma est essentiel à la virulence de *Pseudomonas aeruginosa*(1). De précédents travaux de notre équipe ont montré que ce système conférait à *P. aeruginosa* une meilleure tolérance au cuivre. Or dans le contexte infectieux, le cuivre est utilisé par le système immunitaire comme agent anti-bactérien(2). En effet, le cuivre est un élément essentiel pour les bactéries mais peut devenir toxique en trop grande concentration. Sa toxicité passe entre autres par sa capacité à faire compétition avec le fer dans les centres fer-soufre des protéines et par l'induction d'un stress oxydatif. Mon travail de thèse a pour objectif de mieux comprendre le rôle que joue le système Tat et ses substrats dans la tolérance au cuivre de *Pseudomonas aeruginosa*.

### Matériels et méthodes

- Etude de la régulation des gènes par fusion des promoteurs en amont de l'opéron lux et cultures bactériennes en plaques 96 puits dans différentes conditions. - Tests de sensibilité au cuivre de différentes souches bactériennes par culture sur plaque 96 puits.

### Résultats

Parmi les 34 protéines identifiées par l'équipe comme étant des substrats du système Tat de *P. aeruginosa*(3), nous en avons identifié trois qui pourraient être de bons candidats pour expliquer la sensibilité du mutant tat au cuivre. En effet, une première approche ciblée a permis de mettre en évidence une homologie de séquence chez deux des 34 substrats Tat avec des protéines de résistance au cuivre de la famille des Multi-copper oxidase. En parallèle, le criblage d'une banque de mutants, délétés chacun d'un gène codant un substrat du système Tat, a révélé un troisième candidat : une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse d'un sidérophore. Dans la suite de ce travail, le profil d'expression des trois gènes d'intérêt ainsi que la fonction des trois candidats dans la résistance au cuivre ont été étudiés. Nos résultats suggèrent que *P. aeruginosa* possèdent au moins deux systèmes de résistance au cuivre pour se défendre d'une intoxication à ce métal.

### Discussion et conclusions

Nos perspectives consisteront à tester l'hypothèse que ces deux systèmes sont importants au cours de l'infection en mesurant leur implication dans la survie du pathogène aux mécanismes bactéricides des macrophages puisque le stress cuivre et la carence en fer sont deux des conditions auquel celui-ci doit faire face dans le phagolysosome lors de la phagocytose.

### Références

1. Ochsner, U. A., Snyder, A., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 8312–8317 (2002).
2. Gimenez, M. R. et al. Genome wide identification and experimental validation of *Pseudomonas aeruginosa* Tat substrates. *Sci. Rep.* 8, 11950 (2018).
3. Host and Pathogen Copper-Transporting P-Type ATPases Function Antagonistically during *Salmonella* Infection. <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/IAI.00351-17>  
doi:10.1128/IAI.00351-17.

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## GERGES Elias

### CARACTERISATION DU ROLE DE LA PROTEINE LSR2 DANS LA VIRULENCE DES MORPHOTYPES LISSES ET RUGUEUX DE MYCOBACTERIUM ABSCESSUS.

Elias GERGES, Vincent LE MOIGNE, Jean-Louis HERMANN, Frédéric CREMAZY,  
Laboratoire « Infection et inflammation », INSERM/UVSQ U1173, Montigny-le-Bretonneux

#### Objectifs

*Mycobacterium abscessus* (Mabs), un pathogène émergent dans la mucoviscidose. Elle représente entre 16 et 51% des mycobactéries atypiques isolées chez les patients atteints de mucoviscidose. Cette bactérie évolue au cours de l'infection pulmonaire entre un morphotype lisse (S) et un morphotype rugueux (R). Ce dernier, hyper-virulent et hyper-pro-inflammatoire, est associé aux formes graves de la maladie. Cependant, les facteurs déclenchant ainsi que les mécanismes moléculaires responsables et résultant de cette transition S/R in vivo restent encore inconnus. Nous avons récemment isolé un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines associées au nucléoïde (NAP) nommée Lsr2, différenciellement exprimé entre les variants S et R. Nous avons précédemment montré que Lsr2 était impliquée dans la résistance aux dérivés oxydés ainsi que dans la virulence de Mabs, à la fois dans les modèles cellulaires et animaux. L'objectif de ce projet est d'utiliser une approche intégrative basée sur des méthodes de génomique fonctionnelle et de microscopie super-résolution afin de comprendre le rôle de Lsr2 dans la virulence et la multi-résistance aux antibiotiques de ce pathogène.

#### Matériels et méthodes

L'appartenance de Lsr2 à la famille des NAP suggère un lien entre structure du chromosome et régulation de la transcription des gènes impliqués dans la virulence de Mabs via la transition entre les morphotypes S et R. Nous conduisons une étude transcriptomique afin de mettre en évidence les gènes cibles de Lsr2 dans ces 2 morphotypes. En parallèle, l'utilisation de la technique d'immunoprécipitation de Chromatine associée au séquençage haut-débit (ChIPseq) nous permettra de comprendre le mode de liaison de Lsr2 sur le chromosome conduisant à la régulation de ses cibles directes. Enfin, nous utilisons la microscopie haute-résolution de type PALM afin d'étudier la distribution subcellulaire de cette protéine dans la bactérie.

#### Résultats

L'analyse différentielle de l'expression de gènes montre que 215 gènes sont régulés par Lsr2 chez le morphotype R et 385 gènes chez le morphotype S. Nous avons trouvé que Lsr2 active des gènes de résistance aux nombreuses familles d'antibiotiques (macrolides,  $\beta$ -lactamines, aminoglycosides...). De même, elle joue un rôle dans l'activation des gènes impliqués dans la synthèse et réparation de l'ADN, survie et croissance intracellulaire, et dans la régulation des gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la reconnaissance et invasion des cellules hôtes. En plus, nous avons trouvé que Lsr2 est impliqué aussi dans la régulation des gènes qui codent pour des protéines de transport comme les protéines MmpL.

#### Discussion et conclusions

L'analyse transcriptomique par RNAseq montre que Lsr2 est impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes, tant dans la forme S que dans la forme R. Si les premières expériences de ChIP-seq montrent, à l'instar des autres NAP, une fixation de Lsr2 sur une grande partie du génome, sa localisation observée par PALM suggère une compartimentalisation de la protéine dans une région contrainte du nucléoïde. L'étude de Lsr2 par les autres approches génomiques va permettre de comprendre mieux son rôle dans la pathobiologie de Mabs.

#### Références

Le Moigne V, Bernut A, Cortès M, Viljoen A, Dupont C, Pawlik A, Gaillard JL, Misguich F, Crémazy F, Kremer L, Herrmann JL. Lsr2 Is an Important Determinant of Intracellular Growth and Virulence in *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol.* 2019 Apr 30;10:905. Roux AL, Viljoen A, Bah A, Simeone R, Laencina L, Deramaudt, Rottman M, Gaillard JL, Majlessi L, Brosch R, Misguich F, Vergne I, de Castellier C, Kremer L, Herrmann JL. The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol.* 2016 Nov;6(11):160185

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui  
ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Oui  
BLANCHE POUR VAINCRE : NON  
AUTRE :

## HAJJAR Helene

### ETUDE DE L'INFECTION PERSISTANTE CHEZ L'EMBRYON DE POISSON-ZEBRE INFECTE PAR PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Helene Hajjar, Anne Blanc-Potard

LPHI (Laboratory of Pathogen Host Interactions) - UMR CNRS 5235, Montpellier

#### Objectifs

- Evaluer la persistance de *P. aeruginosa* (l'un des agents pathogènes nosocomiaux les plus courants qui augmente le risque de décès chez les patients atteints de mucoviscidose) lors de l'infection de l'embryon de poisson-zèbre. - Etudier la localisation ainsi que les caractéristiques des bactéries persistantes (intracellulaires, agrégats...) - Examiner l'interaction de *Pseudomonas aeruginosa* avec les macrophages de l'hôte

#### Matériels et méthodes

Nous avons injecté la souche sauvage *P. aeruginosa* PAO1 (différentes doses d'infection) et des souches mutantes (*oprF* et *mgtC*) exprimant la protéine fluorescente verte (GFP : Green Fluorescent protein) dans le ventricule cérébral postérieur d'embryons transgéniques de poisson-zèbre ayant des macrophages marqués en rouge (*mCherry*). Nous avons compté (Unité Formatrice de Colonie = UFC) et visualisé les bactéries (imagerie en temps réel) 1, 2, 3 et 4 jours après l'injection.

#### Résultats

Les bactéries *P. aeruginosa* persistent jusqu'à 4 jours après l'infection. Ces bactéries persistantes peuvent être phagocytées par les macrophages, comme le montre l'imagerie en temps réel. Fait intéressant, nous avons également observé des amas bactériens.

#### Discussion et conclusions

Nous avons pu trouver des bactéries *P. aeruginosa* qui persistent jusqu'à 4 jours après l'infection. Ces bactéries persistantes peuvent être à l'intérieur ou à l'extérieur des macrophages en formant certaines fois des amas. Ces amas pourraient être considérés comme des précurseurs du biofilm. La formation de biofilm entraîne une résistance aux antibiotiques et augmente le risque de décès chez les patients atteints de mucoviscidose. Pour conclure, ces résultats permettent de mieux comprendre comment l'immunité innée et les facteurs de virulence contribuent à une infection persistante de *P. aeruginosa*.

#### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Oui

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : Fondation de coopération scientifique "Méditerranée Infection"

# INFECTION PAR *Pseudomonas aeruginosa* CHEZ LE POISSON-ZEBRE

Hajjar, Hélène

LPHI (Laboratory of Pathogen-Host Interactions)

Université de Montpellier

## Comment un pathogène résiste aux défenses de l'hôte dans le cas d'une infection chronique ? Développement d'un modèle d'infection persistante chez le poisson-zèbre

- *Pseudomonas aeruginosa*, responsable d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose
- L'immunité innée a un rôle clé dans les défenses de l'hôte
- Modèle embryon poisson-zèbre: petit vertébré, transparent

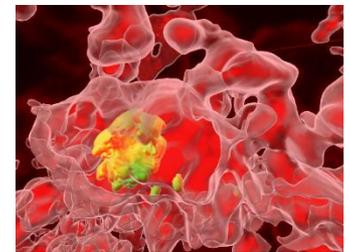
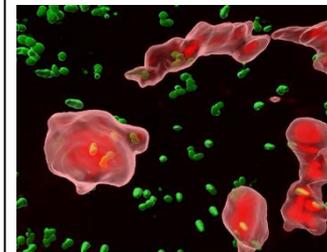
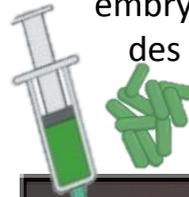
## Quelles sont les perspectives pour les patients ?

- Mieux comprendre comment *P. aeruginosa* résiste à l'immunité innée à l'hôte et établit une infection persistante
- Ce nouveau modèle animal permettra de tester des thérapies innovantes alternatives aux antibiotiques pour combattre les infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose

Financeurs autres que VLM



Injection de *Pseudomonas aeruginosa*-GFP dans les embryons poisson-zèbre avec des **macrophages rouges**



## ILLOUZ Morgane

### ROLE DES GLYCOPEPTIDOLIPIDES DANS LA SPECIFICITE DES INTERACTIONS ENTRE MYCOBACTERIOPHAGES ET MYCOBACTERIUM ABSCESSUS

Morgane Illouz, Wassim Daher, Laurent Kremer

1. Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), CNRS UMR 9004, Université de Montpellier

#### Objectifs

Déterminer l'implication directe ou indirecte des glycopeptidolipides (GPL) dans la reconnaissance phagique des bactéries pour mieux appréhender la spécificité d'action des phages contre les différents variants de *M. abscessus*.

#### Matériels et méthodes

**Génération de mutants** Le vecteur suicide pUX1-katG a été utilisé pour générer les différents mutants après clonage des régions nucléotidiques situées en amont et en aval du gène d'intérêt. Après transformation dans la souche lisse *M. abscessus* CIP104536T, des colonies ont été sélectionnées sur base de leur résistance à la kanamycine et présence d'une fluorescence rouge. Les mutants de délétion ont ensuite été sélectionnés en présence d'isoniazide et sur base de leur sensibilité à la kanamycine.

**Analyse des GPL** Suite à l'extraction des lipides apolaires à partir de tapis bactériens, les GPL sont extraits avec différents mélanges chloroforme/méthanol/0,3% NaCl. Les extraits lipidiques sont mélangés en présence de chloroforme/0,3% NaCl et centrifugés pour extraire la phase organique. Les échantillons resuspendus après évaporation sont séparés sur des plaques de silice dans le solvant de migration chloroforme/méthanol/eau. Les GPL sont révélés avec un mélange Orcinol/acide sulfurique.

#### Résultats

Des mutants de *M. abscessus* exprimant à leur surface des GPL tronqués à différents niveaux dans leur structure ont été générés (fmt, gtf1, gtf2, gtf3, atf1, atf2). La caractérisation biochimique des mutants atf1 et atf2 semble indiquer que l'acétylation des GPL ne dépend pas uniquement des acétyltransferases (Atf) du locus de biosynthèse des GPL. Une étude est en cours pour déterminer quelle(s) Atf(s) additionnelle(s) pourraient participer dans ce processus. A l'aide d'un phage actif contre la souche rugueuse de référence (CIP104536T), nous étudierons la sensibilité des différents mutants GPL pour déterminer quelle(s) partie(s) structurale des GPL peut bloquer l'action des phages contre les souches lisses.

#### Discussion et conclusions

Les nombreux échecs thérapeutiques suite à des infections par *M. abscessus* chez des patients atteints de mucoviscidose stimulent le développement de nouvelles alternatives de traitement. Les mycobacteriophages représentent une arme indéniable dans cette quête et ont montré leur efficacité dans une étude compassionnelle en 2019. Malheureusement, leur très haute spécificité d'action peut limiter leur usage thérapeutique. En effet, une récente étude<sup>1</sup> suggère l'inefficacité des phages testés face aux souches lisses tandis que 80% des souches rugueuses sont sensibles à au moins un phage. La présence de GPL à la surface des souches lisses pourrait donc impacter l'adhésion/interaction des phages avec le bacille. Ainsi, les différents mutants générés au cours de cette étude seront mis à profit pour tester l'efficacité d'un phage initialement actif contre la souche CIP104536T rugueuse. Ces travaux nous renseigneront sur la structure chimique minimale des GPL rendant la souche résistante aux phages. A terme, cette étude sera mise à profit pour amplifier le répertoire de phages thérapeutiques à disposition du clinicien dans le traitement des patients atteints de mucoviscidose et infectés chroniquement avec *M. abscessus*.

#### Références

Dedrick et al. *M. abscessus* Strain Morphotype Determines Phage Susceptibility, the Repertoire of Therapeutically Useful Phages, and Phage Resistance ». *mBio* 12:e03431-20.

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Oui

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## JOUAULT Albane

### CG-BIGDEF1, UN BON CANDIDAT POUR TRAITER LES INFECTIONS A STAPHYLOCOCCUS AUREUS ?

A. Jouault 1, G. Dupuis 1, Z. Xu 1, N. De San Nicolas 2, D. Destoumieux-Garzon 2, L. Touqui 3

1. Sorbonne Université, INSERM UMR\_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris 2. CNRS, Université de Montpellier, IFREMER, UPVD, Montpellier 3. Cystic fibrosis and Bronchial diseases team-INSERM U938, Institut Pasteur, Paris

#### Objectifs

Les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) infectent les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose de façon chronique. Les peptides antimicrobiens (AMP) représentent une alternative aux antibiotiques mais ils perdent souvent leur activité bactéricide dans des conditions in vivo. Cette perte d'activité est multifactorielle mais un problème majeur est la concentration anormale en sel dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose qui perturbent leur activité. Le peptide BigDef1 issue de l'huitre *Crassostrea gigas* (Cg-BigDef1) maintient son activité antibactérienne à de fortes concentrations en sel grâce à un domaine N-term et est actif contre des souches SARM (1). Il présente ainsi un bon potentiel pour traiter les infections à *S. aureus* chez les patients atteints de mucoviscidose. L'objectif de l'étude est d'explorer le potentiel thérapeutique de Cg-BigDef1 dans un contexte de mucoviscidose et son innocuité envers les cellules épithéliales des voies aériennes humaines.

#### Matériels et méthodes

Dans un premier temps, la cytotoxicité et la réponse proinflammatoire du peptide envers des cellules épithéliales des voies aériennes humaines ont été déterminées. Dans un second temps, l'efficacité de Cg-BigDef1 contre *S. aureus* a été évaluée en présence de ces mêmes cellules. Une potentielle induction de la résistance de *S. aureus* envers le peptide est en cours d'étude.

#### Résultats

Nos résultats montrent que Cg-BigDef1 conserve son activité bactéricide en présence de cellules épithéliales des voies aériennes humaines et nous n'avons pas observé d'effet proinflammatoire ou de cytotoxicité du peptide envers ces cellules épithéliales.

#### Discussion et conclusions

Cg-BigDef1 peut représenter un bon candidat pour traiter les infections SARM des voies aériennes chez les patients atteints de mucoviscidose. Cependant, des tests supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer le réel potentiel du peptide dans des thérapies. Cela inclut la stabilité et la pharmacocinétique du peptide dans un contexte de mucoviscidose et les résultats du test d'induction de la résistance.

#### Références

(1) : Loth et al. mbo. 2019

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : ANR

## LAGUNE Marion

### LES PROTEINES SECRETEES PAR LE SYSTEME ESX-4 DE MYCOBACTERIUM ABSCESSUS (MABS) : LEUR IMMUNOGENICITE ET LEUR ROLE

Marion Lagune<sup>1</sup>, Aurore Desquesnes<sup>1</sup>, Vincent Le Moigne<sup>1</sup>, Hamadoun Touré<sup>1</sup>, Matt Johansen<sup>6</sup>, Flor Vásquez Sotomayor<sup>2</sup>, Thomas Gutschmann<sup>3</sup>, Florian Maurer<sup>2</sup>, Laleh Majlessi<sup>4</sup>, Roland Brosch<sup>5</sup>, Laurent Kremer<sup>6</sup>, Jean-Louis Herrmann<sup>1</sup>, Fabienne Girard-Misguich<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> U1173 Infection et Inflammation, UVSQ/INSERM, Montigny le bretonneux, France <sup>2</sup> National and WHO Supranational Reference Center for Mycobacteria, Research Center Borstel, Leibniz Lung Center, Borstel, Germany <sup>3</sup> Division of Biophysics, Research Center Borstel, Leibniz Lung Center, Borstel, Germany <sup>4</sup> Institut Pasteur-TheraVectys Joint Lab, Institut Pasteur, Paris, France <sup>5</sup> Unité de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée, Institut Pasteur, Paris, France <sup>6</sup> Centre National de la Recherche Scientifique UMR 9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, France

#### Objectifs

Les mycobactéries possèdent un système de sécrétion de type VII (SST7), dénommé ESX. Mabs, pathogène opportuniste chez l'homme, possède deux loci : *esx-3* et *esx-4*. ESX-4 est un acteur essentiel à la survie intracellulaire de Mabs au sein des cellules phagocytaires (1) à l'instar du locus *esx-1* de *Mycobacterium tuberculosis*. Nous étudions les protéines sécrétées par le système ESX-4 de Mabs, leur rôle dans la virulence ainsi que leur reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. L'analyse comparative du sécrétome de la souche sauvage et des mutants du système de sécrétion ESX-4 a permis d'identifier plusieurs candidats, dont EsxU et EsxT ainsi que des PE/PPE (1).

#### Matériels et méthodes

Nous avons obtenu un mutant par Knock-out pour *esxU* et *esxT* ( $\Delta$ *esxU/T*) et nous disposons de mutants pour des protéines structurales du système ESX-4 et 3. La réponse cellulaire T vis-à-vis des protéines sécrétées est étudiée par la mesure d'interféron gamma produit par les splénocytes de la souris, après une injection sous-cutanée de Mabs

#### Résultats

Nous avons d'abord démontré la localisation de ces protéines chez Mabs, EsxU et EsxT sont associées avec la membrane et sont aussi retrouvées dans le surnageant de culture. De plus, EsxU et EsxT forme un complexe, ci-après nommé EsxUT, caractéristique des protéines Esx sécrétées par les systèmes de sécrétion ESX des mycobactéries. Notre collaboration avec des équipes allemandes a permis de démontrer in vitro que ces protéines sont capables d'interagir avec des membranes artificielles et de former des structures semblables à des pores. Dans les macrophages, l'expression d'*esxU* et *esxT* est induites pendant les premières 24 heures d'une infection à Mabs, bien que leur absence n'influence pas le comportement intracellulaire de la souche mutée, mais empêche la rupture de la membrane phagosomale, maintenant Mabs  $\Delta$ *esxUT* dans un phagosome non acidifié. Enfin, nous identifions un phénotype hypervirulent associé à la délétion d'*esxUT*, caractérisé par une augmentation de la mortalité et de la croissance bactérienne chez la souris et le poisson zèbre (collaboration avec IRIM, Montpellier). EsxU et EsxT ayant une fonction similaire aux protéines EsxA et EsxB sécrétées par l'ESX-1 et ces dernières étant utilisé dans le diagnostic de la tuberculose, nous avons voulu étudier le potentiel immunogène de ces protéines. La réponse lymphocytaire T, vis-à-vis de peptides représentant l'intégralité des protéines EsxU et EsxT n'a pas permis d'identifier de peptides induisant une réponse T. Le sécrétome ainsi qu'une analyse bio-informatique basée sur la recherche de motifs de sécrétion ont permis d'identifier d'autres substrats potentiels de SST7 chez Mabs. Deux protéines PE/PPE ont des peptides qui induisent une réponse immunitaire de type Th1.

#### Discussion et conclusions

L'ensemble de nos résultats suggèrent que l'absence d'*EsxUT* améliore la survie et la persistance de Mabs chez les animaux. Nous testons actuellement la réponse IFN $\gamma$  des PE/PPE suite à l'inoculation de la bactérie sauvage ou de différents mutants du système de sécrétion ESX-4 et ESX-3 pour déterminer par quel système ces protéines sont sécrétées. Néanmoins des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces protéines représentent de bonnes cibles de diagnostic chez les patients capables de discriminer les infections à Mabs des infections causées par d'autres mycobactéries.

#### Références

1. Laencina L, Dubois V, Le Moigne V, Viljoen A, Majlessi L, Pritchard J, et al. Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 30;115(5):E1002–11.

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Oui

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## LEFEBVRE Delphine

### CARACTERISATION D'UNE NOUVELLE PHOSPHOLIPASE ANTIBACTERIENNE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Delphine Lefebvre, Chantal Soscia, Bérangère Ize & Sophie Bleves

1. Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, CNRS, Aix-Marseille University, Marseille, France

#### Objectifs

Le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* est responsable d'infections chroniques sévères chez les patients immunodéprimés comme les malades atteints de la mucoviscidose. Développer de nouvelles stratégies anti-virulence en alternative aux antibiotiques est primordial et commence par le décryptage des mécanismes moléculaires de virulence. Notre équipe s'intéresse aux toxines, sécrétées par le système de sécrétion de type VI (T6SS), qui sont employées pour prendre contrôle de l'hôte ou éliminer d'autres bactéries. Le T6SS fonctionne comme une arbalète qui injecte une flèche chargée en toxines dans les cellules cibles. Le projet est centré sur la caractérisation d'une nouvelle toxine antibactérienne de *P. aeruginosa*, la phospholipase Tle1 (1). Nos objectifs sont de déterminer, i) l'identité de l'antitoxine qui contrecarre son activité et ii) son mécanisme et ses partenaires de sécrétion. Le gène *tle1* est dans un locus contenant 4 autres gènes, dont les produits sont des candidats pouvant exercer ces fonctions.

#### Matériels et méthodes

Des tests de toxicité hétérologue ont été employés pour confirmer l'identité de l'antitoxine de Tle1. Ils consistent à la co-production chez *Escherichia coli* de la toxine et de ses antitoxines. Le double hybride a été utilisé pour détecter des interactions entre Tle1 et ses antitoxines. L'effet antibactérien de Tle1 et son mode de sécrétion ont été étudiés par des tests de compétition. Ils consistent à co-cultiver différentes souches de *P. aeruginosa* attaquant avec une souche cible ne produisant plus les antitoxines de Tle1 et à suivre le nombre de cibles survivantes ayant poussées sur milieu sélectif.

#### Résultats

Le caractère antibactérien de Tle1 a été confirmé en identifiant son compartiment cellulaire d'action, le périplasme, par le test de toxicité hétérologue chez *E. coli*. Le double hybride a révélé des interactions entre Tle1 et deux antitoxines candidates (Tli1a et Tli1b) codées par le locus de *tle1*. La fonction antitoxine de Tli1b a été montrée par le test de compétition intra-*Pseudomonas*. Cette approche a apporté des conclusions sur le mécanisme de sécrétion de Tle1 : l'implication d'une des trois machineries T6SS de *P. aeruginosa* (H2-T6SS) et de la protéine de la pointe perforatrice de la flèche du T6SS codée par le gène *vgrG4a* du locus *tle1*. Le double hybride a montré l'interaction de *VgrG4a* et de *Tla1*, une potentielle protéine chaperonne dont le gène est codé dans le locus *tle1*.

#### Discussion et conclusions

Pour étudier le mécanisme moléculaire de neutralisation de Tle1 par ses deux antitoxines, caractéristique rare dans la littérature, des approches structurales de cristallisation aux rayons X seront utilisées durant cette thèse. Nos résultats ont mis en exergue l'effet antibactérien de Tle1, qui pourrait favoriser l'établissement de *P. aeruginosa* au sein du microbiote pulmonaire. Chez les malades atteints de la mucoviscidose, bien qu'elle ne soit pas la plus fréquemment retrouvée chez les jeunes patients, elle devient le pathogène majoritaire à l'âge adulte. Il est envisageable que les poumons soient le lieu d'une compétition entre *P. aeruginosa* et d'autres agents pathogènes souvent rencontrés comme *Burkholderia* et *Acinetobacter* qui possèdent des T6SS. L'effet de Tle1 dans cette concurrence sera analysé par des tests de compétition inter-espèces. Etant sécrétée par la machinerie H2-T6SS, impliquée dans l'internalisation de *P. aeruginosa* dans des cellules non phagocytaires de l'hôte et dans l'autophagie (2,3,4,5), le rôle anti-eucaryote de Tle1 sera testé grâce à des tests d'infection de lignées cellulaires.

#### Références

(1) Hu et al. (2014) doi:10.1107/S1399004714012899 (2) Berni et al. (2019) doi : 10.3389/fmicb.2019.01218 (3) Sana et al. (2012) doi:10.1074/jbc.M112.376368 (4) Jiang et al. (2014) doi: 10.1016/j.chom.2014.04.010 (5) Jiang et al. (2016) doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.012

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : CNRS, Aix-Marseille Université, IM2B

## LEVEQUE Manuella

### CORRECTION DE F508DEL-CFTR PAR ELEXACAFTOR/IVACAFTOR/TEZACAFTOR : DESCRIPTION PHARMACOLOGIQUE ET MECANISME D'ACTION

Manuella Lévêque, Sandra Mirval, Anne Cantereau et Frédéric Becq  
Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Université de Poitiers, Poitiers, France.

#### Objectifs

Le Trikafta est la nouvelle thérapeutique innovante et efficace pour les patients ayant au moins une mutation F508del. Ce traitement est une trithérapie qui correspond à l'association de deux correcteurs de la structure tridimensionnelle, l'elexacftor et le tezacftor (VX445 et VX661 respectivement) ainsi que d'un potentiateur, l'ivacftor (VX770). Dans notre étude, l'objectif est d'analyser en détails les propriétés de la protéine F508del-CFTR corrigée par le Trikafta.

#### Matériels et méthodes

En résumé, nous avons comparé la fonction du F508del-CFTR dans des modèles de cellules épithéliales pulmonaires en présence d'elexacftor, de tezacftor, ou de la combinaison des deux correcteurs avec ou sans ivacftor. Nous avons étudié l'interaction et la maturation de la protéine F508del-CFTR par immunoprécipitation, par le PLA assay, par western blot et par immunolocalisation. Enfin nous avons enregistré l'activité de F508del-CFTR par chambre de Ussing et par patch-clamp en configuration cellules entières.

#### Résultats

Nous avons montré que la combinaison elexacftor/tezacftor/ivacftor est efficace afin de restaurer la maturation de la protéine immature F508del-CFTR, sa localisation à la membrane apicale ainsi que sa fonctionnalité bien que l'ivacftor limite ces effets (Becq et al., 2021). En effet, la combinaison elexacftor/tezacftor montre une synergie d'action mais l'addition d'ivacftor affecte la stabilité de la protéine F508del-CFTR à la membrane plasmique. Par ailleurs, nous montrons aussi que l'elexacftor et le tezacftor affecte de façon différente les interactions de de la protéine F508del-CFTR avec de multiples protéines chaperonnes telles que HSC70 et HSP90.

#### Discussion et conclusions

Nos travaux montrent ainsi que l'ivacftor diminue l'efficacité de correction du Trikafta. Ainsi nous pouvons penser que la combinaison elexacftor/tezacftor associée avec un autre potentiateur pourrait améliorer l'efficacité thérapeutique pour le traitement des patients atteints de la mucoviscidose. De plus, le mécanisme d'action différent de l'elexacftor et du tezacftor dans le processus de maturation de la protéine F508del-CFTR vers la membrane plasmique pourrait expliquer la synergie d'action observée. Les objectifs pour la suite sont donc d'étudier tous les acteurs de la voie de maturation de la protéine F508del-CFTR, de la maturation vers la membrane plasmique jusqu'au recyclage de la protéine, en présence des composants du Trikafta. Ce travail est supporté par Vaincre La Mucoviscidose (RF20200502704).

#### Références

Becq et al., 2021, The rescue of F508del-CFTR by elexacftor/tezacftor/ivacftor (Trikafta) in human airway epithelial cells is underestimated due to the presence of ivacftor. Eur Respir J., doi: 10.1183/13993003.00671-2021.

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## NAJM Matthieu

### IDENTIFICATION DE NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES POUR LA MUCOVISCIDOSE PAR DES APPROCHES DE BIOLOGIE DES SYSTEMES

Matthieu Najm (1, 2, 3), Loredana Martignetti (1, 2, 3) Matthieu Cornet (1, 4, 5) Mairead Aubert (4, 5) Isabelle Sermet-Gaudelus (4, 5) Laurence Calzone (1, 2, 3) Véronique Stoven (1, 2, 3)

1. Mines ParisTech, PSL Research University, Paris 2. Institut Curie, Paris 3. INSERM U900, Paris 4. Institut Imagine, Paris 5. Hôpital Necker - Enfants Malades

#### Objectifs

La mucoviscidose est causée par des mutations du gène codant la protéine CFTR, canal chlorure (Cl-) de la membrane des cellules épithéliales. Pourtant la physiopathologie globale de la maladie (insuffisance respiratoire, infection chronique, inflammation avant infection) ne peut être expliquée complètement et directement par le canal Cl- déficient. Ces observations soulèvent l'hypothèse que la maladie n'est peut-être pas due au dysfonctionnement de CFTR seule mais plutôt au dérèglement d'un réseau complexe de protéines qui interagissent entre elles et avec CFTR. En utilisant des approches de biologie des systèmes et des données d'études transcriptomiques, le but de ce projet est de construire le réseau biologique résumant les perturbations moléculaires de la cellule épithéliale, auquel CFTR-F508del appartient. Nous pourrons alors analyser ce réseau et rechercher parmi les protéines de ce réseau de nouvelles cibles thérapeutiques dont l'inhibition ou l'activation réduirait les dysfonctionnements.

#### Matériels et méthodes

Nous avons d'abord établi une liste de gènes pertinents dans la mucoviscidose en nous basant sur: (1) les principaux gènes et protéines décrits dans la littérature comme jouant un rôle dans la maladie; (2) une méta-analyse d'études transcriptomiques déjà publiées, portant sur des cellules épithéliales de voies respiratoires humaines dans le contexte de la maladie; (3) les voies biologiques présentant une différence d'activité entre les patients et les contrôles. Enfin, nous avons construit le réseau biologique à partir de cette liste de gènes et des bases de données d'interactions protéine-protéine.

#### Résultats

Les analyses topologiques de ce réseau ont révélé des communautés de gènes et des hubs (i.e. des nœuds fortement connectés). Elles mettent en évidence comment CFTR-F508del est liée aux dérégulations moléculaires de diverses voies biologiques, en particulier aux voies de l'inflammation. Nous avons également identifié des nœuds (i.e. des protéines) qui pourraient être supprimés pour perturber les voies conduisant aux phénotypes malades.

#### Discussion et conclusions

La modélisation dynamique de ce réseau permettra de comprendre comment les perturbations de ces nœuds corrigent les phénotypes malades, et de suggérer de nouvelles stratégies thérapeutiques complémentaires à celles ciblant la restauration de la maturation de CFTR-F508del.

#### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : OUI

AUTRE :

## SIMONNEAU Benjamin

### MODULATION PHARMACOLOGIQUE DE COMMD1 : EFFET STABILISATEUR DE CFTR-F508DEL DANS LE CONTEXTE DE LA MUCOVISCIDOSE ?

B. Simonneau<sup>1,2</sup>, S. Simon<sup>1,2</sup>, V. Escabasse<sup>1,2</sup>, F. Becq<sup>3</sup>, M.G. Vallespi<sup>4</sup>, P. Fanen<sup>1,2</sup>, A. Aissat<sup>1,2</sup>

1. INSERM, U955, IMRB, Créteil, France. 2. Université Paris-Est, Créteil, France. 3. CNRS-ER L7003 - TIME, Université de Poitiers, Poitiers, France. 4. Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), La Havane, Cuba.

#### Objectifs

COMMD1 a été identifié comme un partenaire protéique de CFTR et dont la surexpression stabilise CFTR à la surface des épithéliums<sup>1</sup> et exerce un potentiel anti-inflammatoire dans le contexte de la mucoviscidose<sup>2</sup>. Une équipe cubaine a développé un peptide (CIGB-552) permettant à la fois de surexprimer COMMD1<sup>3</sup> et de réduire la réponse inflammatoire dans différents modèles humains et murins<sup>4</sup>. L'objectif de ce projet est d'utiliser le CIGB-552 dans des modèles de mucoviscidose afin d'évaluer la maturation, la demi-vie et l'activité de CFTR.

#### Matériels et méthodes

- Modèles cellulaires : CFBE-WT et -F508del en immersion ou en interface air-liquide (ALI), HEK-WT et F508del exprimant HS-YFP et des cellules nasales humaines (CENH) de patients et de contrôles.
- Cytotoxicité du peptide évalué par la mesure du LDH relargué.
- Pénétration du peptide CIGB-552 déterminée à l'aide d'une version FITC (cytométrie de flux).
- Expression de COMMD1 et CFTR quantifiée par immunoblot.
- Fonction de CFTR par YFP sensible à l'iode et chambre de Ussing

#### Résultats

Le peptide CIGB-552 (FITC) est détecté dans les CFBE proportionnellement à sa concentration, montrant une bonne capacité de pénétration, avec une absence de cytotoxicité. Nous avons observé que COMMD1 était très exprimé de façon endogène, et que le CIGB-552 ne modifie pas la quantité de protéine COMMD1. Cependant, sa demi-vie est augmentée. En revanche, le CIGB-552 provoque une augmentation significative de COMMD1 dans les cultures primaires de CENH contrôles et de patients mucoviscidose. La fonction de CFTR-F508del évaluée par la méthode HS-YFP montre un gain d'activité lorsque le CIGB-552 est ajouté au traitement Vx-445/Vx-661/Vx-770. Ces résultats sont reproduits en mesure de courant de court-circuit dans des cultures de CENH de patients homozygotes F508del. Pour comprendre le mécanisme, nous avons observé la maturation/correction de CFTR-F508del en présence du traitement CIGB-552/Vx-445/Vx-661, et nous observons une augmentation de la forme C de CFTR en western blot, en présence de la nouvelle thérapie dans le modèle de cellules HEK.

#### Discussion et conclusions

Nos résultats montrent que le peptide CIGB-552 est capable de pénétrer dans différents modèles cellulaires et différentes conditions de culture (CENH ou lignées, monocultures ou ALI). Le rôle du peptide a été évalué sur la maturation et la fonction de CFTR et sa combinaison avec les traitements actuels améliore encore plus la fonction de CFTR. Ce gain de fonction passerait par la capacité du CIGB-552 à stabiliser, ou à favoriser la localisation membranaire de CFTR. Mon objectif cette année est d'étudier la manière dont le CIGB-552 va potentialiser l'effet du Trikafta, en s'intéressant à la densité membranaire de CFTR-F508del, qui pourrait expliquer le gain de fonction.

#### Références

(1) Drévilion et al, 2011 (PMID 21483833) (2) de Becdelièvre et al, 2013 (PMID 23892095) (3) Fernandez Masso, et al, 2013 (PMID 23401744) (4) Vallespi et al. 2020 (PMID 33396282)

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

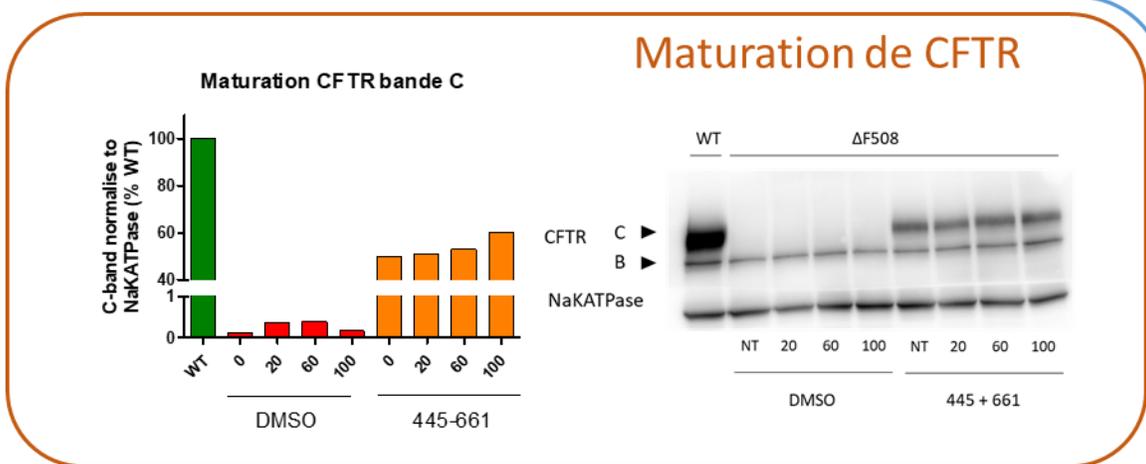
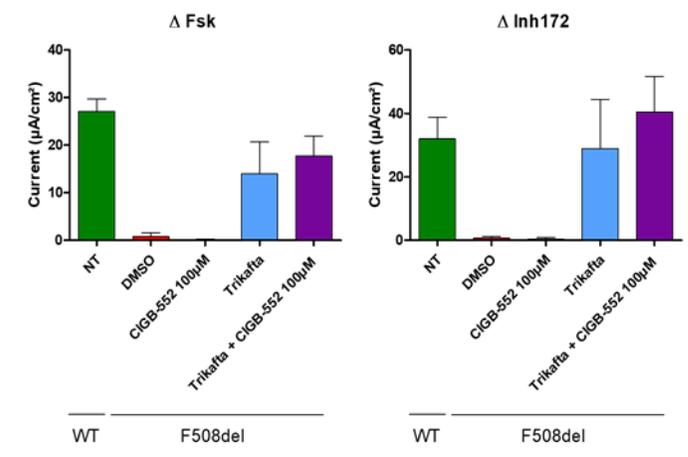
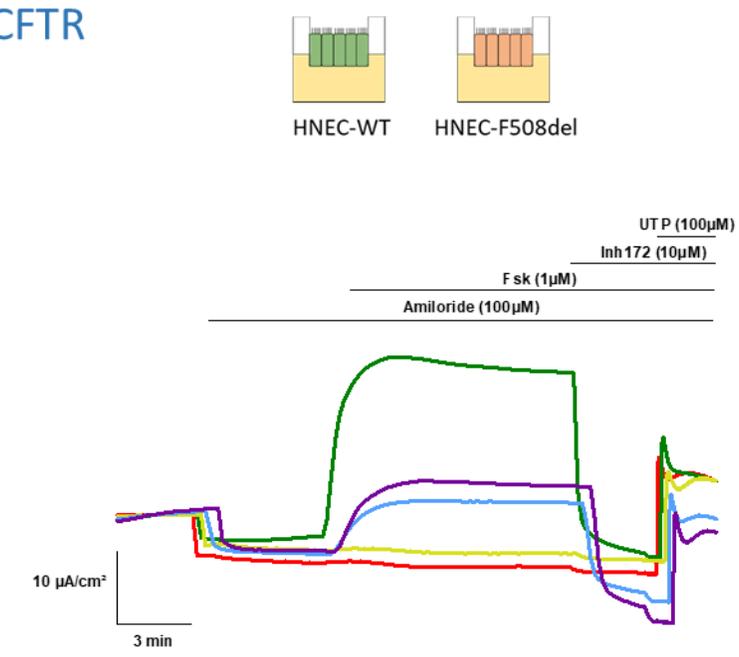
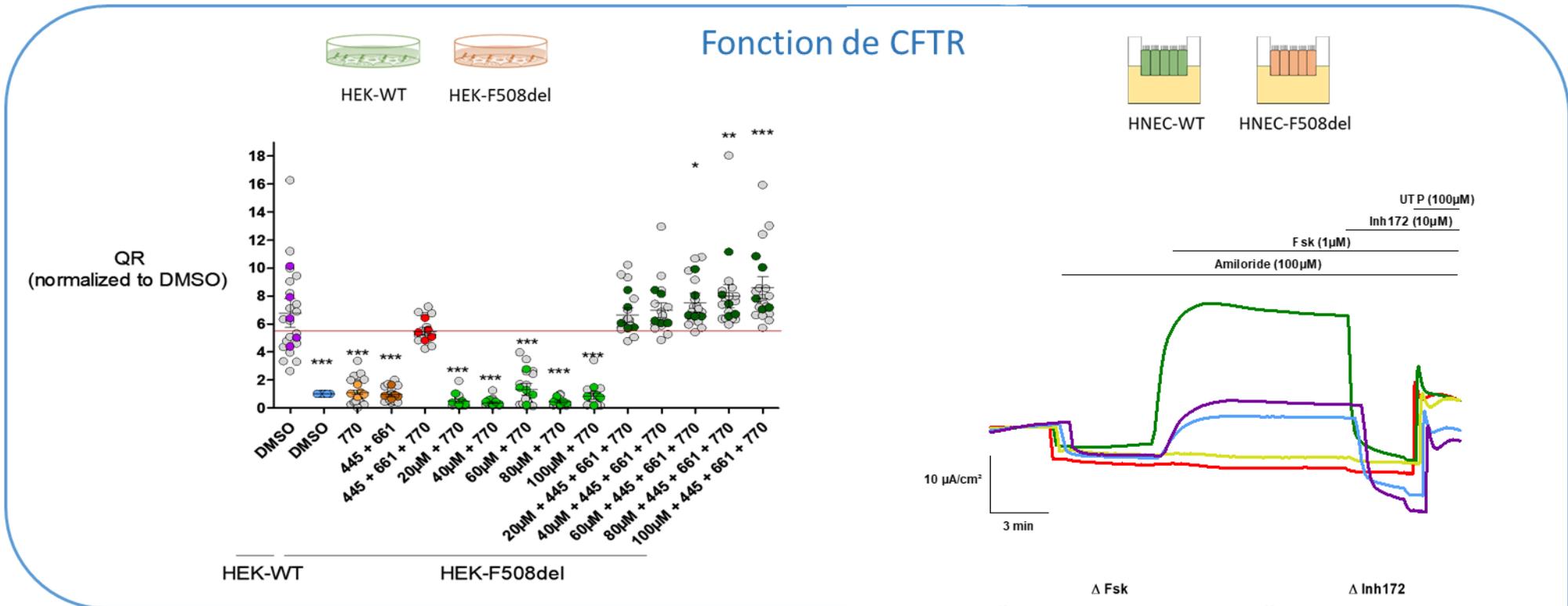
ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : LegPoix

# Modulation pharmacologique de COMMD1 : effet stabilisateur de CFTR-F508del dans le contexte de la mucoviscidose ?

B. Simonneau<sup>1,2</sup>, S. Simon<sup>1,2</sup>, V. Escabasse<sup>1,2</sup>, F. Becq<sup>3</sup>, M.G. Vallespi<sup>4</sup>, P. Fanen<sup>1,2</sup>, A. Aissat<sup>1,2</sup>



**SORLIN Pauline**

## **ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS POSSEDE-IL DES CARACTERISTIQUES SPECIFIQUES QUI POURRAIENT CONTRIBUER A SON EMERGENCE AU COURS DE LA MUCOVISCIDOSE ?**

Pauline Sorlin, Quentin Menetrey, Fabien Aujoulat, Raphaël Chiron, Estelle Jumas-Bilak, Chloé Dupont, Hélène Marchandin  
1.HydroSciences Montpellier, Université de Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier 2 CHU de Montpellier, Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose, Montpellier, 3 CHU de Montpellier, Département d'Hygiène Hospitalière, Montpellier 4 CHU de Nîmes, Service de Microbiologie et d'Hygiène hospitalière, Nîmes, France

### **Objectifs**

L'épaississement du mucus respiratoire observé au cours de la mucoviscidose (CF) favorise la survenue d'infections bactériennes chez les patients. Le pathogène le plus fréquemment identifié est *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). Cependant, le pourcentage de patients colonisés par *Achromobacter xylosoxidans* (Ax) est en augmentation régulière et cette bactérie est considérée comme émergente au cours de la CF. Ax est également un pathogène hors CF, principalement chez des patients immunodéficients. Dans ce contexte, notre objectif était d'étudier des caractéristiques qui pourraient être spécifiquement présentées par les souches d'Ax issues de patients CF (souches CF) comparativement à des souches d'Ax issues de patients non atteints de mucoviscidose (souches NCF) et qui pourraient expliquer le succès d'Ax dans le contexte CF.

### **Matériels et méthodes**

Nous avons étudié 60 souches d'Ax dont 30 souches CF et 30 souches NCF. Les caractéristiques qui ont été étudiées sont : la production de biofilm évaluée par la méthode du crystal violet, la motilité de type swimming étudiée sur gélose spécifique, les capacités compétitives envers une souche de Pa CF et leurs effets sur la croissance évaluée sur gélose Trypticase Soja, la motilité swimming et la production de pigments par Pa (comparaison des résultats observés pour les co-cultures Ax-Pa versus les mono-cultures respectives d'Ax et de Pa).

### **Résultats**

Nos résultats montrent que certaines souches d'Ax ont la capacité de produire une quantité importante de biofilm et ont une motilité swimming importante. Ces caractéristiques ont été observées à la fois pour les souches CF et NCF (production de biofilm équivalente pour les souches CF et NCF et motilité swimming supérieure pour les souches NCF). Certaines souches d'Ax possèdent également la faculté d'inhiber la croissance, la motilité et/ou la production de pigments de Pa. Ces observations ont été réalisées à la fois pour les souches CF et les souches NCF mais de manière plus fréquente pour les souches CF, suggérant que ces dernières présenteraient des capacités compétitives particulières.

### **Discussion et conclusions**

Les caractéristiques bactériennes étudiées dans ce travail n'ont jusqu'alors été que très peu décrites pour Ax ; nos résultats permettent donc d'apporter une description plus complète de ces caractéristiques. De plus, peu d'études évaluent le comportement d'Ax en fonction de l'origine des souches. Nous montrons que les souches d'Ax possèdent des propriétés importantes pour l'établissement d'une infection voire la persistance chez les patients et ce, quelle que soit leur origine, avec toutefois, une propension plus marquée des souches CF pour la compétition bactérienne qui pourrait contribuer à leur succès dans la colonisation des voies respiratoires des patients CF.

### **Références**

Sibley C.D. et al., 2008 Filkins et al., 2015 Registre français de la mucoviscidose 2019 Sayyed et al., 2019 Kirov et al., 2004 Matysik et al., 2019 Beaume et al., 2015 Filipic et al., 2017; Menetrey et al., 2020 Jakobsen et al., 2013.

#### **FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE : projet financé par le CHU de Montpellier

SY Khadeeja

**ROLE DES MEDIATEURS LIPIDIQUES DE LA RESOLUTION DE L'INFLAMMATION DANS L'INTERACTION ENTRE BIOFILM POLYMICROBIEN ET CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES ISSUES DE PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE**

Khadeeja Adam SY, Maelle Briottet, Shirin Bassiri, Isabel Valsecchi, Virginie Escabasse, Jean-Winoc Decousser, Françoise Botterel et Valerie Urbach

1. IMRB, U955, Inserm, Université Paris Est Créteil, UPEC 2. EA Dynamic 7380, Faculté de Santé, Université Paris Est Créteil

**Objectifs**

La mucoviscidose (CF) se caractérise par une infection chronique de l'arbre respiratoire associée à une inflammation persistante et inefficace dans l'élimination des pathogènes qui conduit à une altération progressive de la fonction respiratoire. Le processus inflammatoire est normalement autorégulé par une phase de résolution active qui met en jeu des médiateurs lipidiques spécialisés dans la résolution de l'inflammation (SPMs pour specialized pro-resolving mediators), comme les lipoxines (LX), les résolvines (Rv), les marésines et les protectines. Des anomalies de production de SPMs dans les voies aériennes des patients CF pourraient contribuer à la persistance de l'inflammation et à son inefficacité antibactérienne (1,2,3). Parmi les acteurs responsables de l'infection chronique, *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm), bactérie Gram-négatif émergente et *Aspergillus fumigatus* (Af), champignon filamenteux, peuvent cohabiter dans le tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, notamment sous forme de biofilm (4,5,6). Les objectifs de cette étude s'articulent autour de deux axes principaux avec (i) l'impact des lipides de la résolution de l'inflammation (SPMs) sur la formation de biofilm simple et mixte polymicrobien (Sm et /ou Af) avec et sans épithélium bronchique, (ii) l'impact de ces biofilms sur la biosynthèse des SPMs par les cellules épithéliales CF.

**Matériels et méthodes**

La formation du biofilm complexe en présence ou non de cellules épithéliales des voies respiratoires (lignée cellulaire CFBE410- et cultures primaires d'épithélium nasal) est analysée qualitativement (microscopie confocale et électronique) et quantitativement (Cristal violet et qPCR). L'impact des SPMs est étudié sur l'adhésion et l'invasion d'Af et/ou Sm sur un épithélium respiratoire, sur le maintien de l'intégrité épithéliale (résistance électrique transépithéliale et microscopie confocale) et sur la synthèse de peptides antimicrobiens (RtqPCR, ELISA). La biosynthèse des SPMs est explorée par l'analyse lipidomique du sous-nageant de culture cellulaire par spectrométrie de masse.

**Résultats**

L'étude de l'impact des SPMs sur la formation de biofilm in vitro a été initiée en l'absence de cellules épithéliales. Les résultats préliminaires suggèrent que le SPM RvE2 inhibe la formation de biofilm de Sm sans affecter la croissance des bactéries. Le modèle de cellules épithéliales en culture exposées au biofilm complexe d'Af et Sm est en cours de validation. Les données de microscopie confocale montrent par ailleurs qu'Af altère l'intégrité des jonctions serrées visualisées par l'immunomarquage de la ZO-1 sur des cellules CFBE. Nos observations suggèrent que les biofilms mixtes Af-Sm issus de patients CF sont plus virulents que les souches commercialisées par l'ATCC. Enfin le SPM LXA4 stimule la synthèse du peptide antimicrobien, HBD1.

**Discussion et conclusions**

Ce projet novateur s'appuie sur le développement d'un modèle complexe associant bactérie-champignon-cellules épithéliales issus de patients. Si le rôle des SPMs dans la physiologie des voies aériennes commence à être exploré, leur rôle sur la formation de biofilm polymicrobien dans la mucoviscidose est encore méconnu. L'exploration des mécanismes cellulaires entre SPMs, épithélium et biofilms mixtes a le potentiel d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques

**Références**

1. Briottet M, Shum M, Urbach V. The Role of Specialized Pro-Resolving Mediators in Cystic Fibrosis Airways Disease. *Front Pharmacol.* 2020 Sep 2;11:1290.
2. Ringholz FC, Higgins G, Hatton A, Sassi A, Moukachar A, Fustero-Torre C, Hollenhorst M, Sermet-Gaudelus I, Harvey BJ, McNally P, Urbach V. Resolvin D1 regulates epithelial ion transport and inflammation in cystic fibrosis airways. *J Cyst Fibros.* 2018 Sep;17(5):607-615.
3. Higgins G, Fustero Torre C, Tyrrell J, McNally P, Harvey BJ, Urbach V. Lipoxin A4 prevents tight junction disruption and delays the colonization of cystic fibrosis bronchial epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016 Jun 1;310(11):L1053-61. doi: 10.1152/ajplung.00368.2015.
4. Roisin L, Melloul E, Woerther PL, Royer G, Decousser JW, Guillot J, Dannaoui E, Botterel F. Modulated Response

**FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

## TAREAU Anne-Sophie

### NOUVELLES STRATEGIES DE LUTTE CONTRE LES PATHOGENES OPPORTUNISTES DE L'HOMME, PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Anne-Sophie TAREAU, Sylvie CHEVALIER ; Olivier LESOUHAITIER ; Ali TAHRIQUI  
Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM)

#### Objectifs

Recherche de composés d'origine naturel ayant une activité anti-virulente et/ou antibiofilm pour lutter contre l'antibiorésistance de *Pseudomonas aeruginosa* et/ou *Staphylococcus aureus*

#### Matériels et méthodes

Test de production de pyocyanine : Des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* H103 non traitées (DMSO 1%, v/v) ou traitées avec les composés testés ont été cultivés dans un bouillon Luria-Bertani (LB) dans une microplaque de 96 puits. La plaque a été incubé à 37° C pendant 24 h sous agitation (180 rpm). Après 24 h d'incubation, la croissance cellulaire a été déterminée en mesurant la D.O. à 580 nm. Le dosage de la pyocyanine a été réalisé comme décrit : les surnageants de culture ont été récupérés et un volume de chloroforme a été ajouté. Ensuite, ½ volume d'HCl 0,5 M a été ajouté à la couche de chloroforme (couche bleue). L'absorbance de la couche d'HCl (couche rouge-rose) a été enregistrée à 520 nm et les données ont été normalisées pour la densité cellulaire bactérienne (A580 nm). Objectif : Cribler une multitude de composés envoyés par des partenaires afin de sélectionner ceux diminuant la production de pyocyanine produit par *Pseudomonas aeruginosa*

Test de formation de Biofilm : Des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* H103 non traitées (DMSO 1%, v/v) ou traitées avec les composés testés ont été cultivés dans un bouillon Luria-Bertani (LB) dans une microplaque de 96 puits. Les puits ont été colorés avec du cristal violet puis lavés et élués avec de l'acide acétique suivi par l'absorbance de l'échantillon à 595 nm. Objectif : Cribler une multitude de composés envoyés par des partenaires afin de sélectionner ceux diminuant la formation de biofilm produit par *Pseudomonas aeruginosa*

#### Résultats

Pas encore de résultats

#### Discussion et conclusions

Suite : Les mêmes tests seront utilisés pour *Staphylococcus aureus*. Après sélection de composés intéressants, des études génomiques/transcriptomiques au niveau de *Pseudomonas aeruginosa*/*Staphylococcus aureus* permettront d'avoir une idée des mécanismes moléculaires ciblés par les dits composés

#### Références

Non communiquées

#### FINANCEMENTS

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Non

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

**TIDJANI Abdoul-Razak**

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

Abdoul-Razak TIDJANI, Eric FAUDRY, Ina ATTREE, Bertrand TOUSSAINT, Audrey LE GOUELLEC,

1. Laboratoire Translational Innovation in Medicine and Complexity (TIMC), équipe Translational microbial Evolution and Engineering (TrEE) 2. Institut de Biologie Structurale (IBS), groupe Pathogenèse bactérienne et Réponses Cellulaires (PBRC)

**Objectifs**

A l'aide d'une approche de métabolomique non ciblée, l'équipe a démontré précédemment que les souches de *Pseudomonas aeruginosa* issus de 32 patients adultes atteints de mucoviscidose pouvaient être classées en 3 métabotypes, c'est à dire présentant des profils métaboliques similaires. Au sein de ces métabotypes, les polyamines sont des déterminants forts de l'appartenance à un métabotype. Ces molécules sont bien connues entre autres pour leur rôle en tant que facteurs de croissance chez les pro- et les eucaryotes. Nos travaux avaient démontré une corrélation entre l'augmentation de la production bactérienne de ces métabolites avec 1) l'instabilité de la fonction respiratoire chez les patients, 2) l'augmentation de la cytotoxicité de Pa. Pour identifier les déterminants de l'évolution de la production de polyamines, nous allons utiliser une approche de génomique et transcriptomique comparative entre les souches. A l'aide de mutants, nous validerons l'effet des polyamines sur le phénotype de cytotoxicité des souches de Pa in vitro. Enfin, nous évaluerons l'impact de la production des polyamines sur la virulence de Pa dans un modèle d'infection murin.

**Matériels et méthodes**

Nous disposons d'isolats de Pa récoltés chez 32 patients adultes CF. Ces isolats sont phénotypés au plan de la production de polyamines (putrescine et spermidine) et au plan de leur cytotoxicité sur macrophages et cellules épithéliales. Nous constituerons 2 groupes de 10 isolats soit forts producteurs (isolats PH) soit faibles producteurs (isolats PB) de polyamines. Nous utiliserons une approche comparative des données de génomique et transcriptomique (en cours) en ciblant sur les promoteurs et les gènes codant les enzymes des voies de biosynthèse et catabolisme des polyamines entre les groupes PH et PF. Cette étape nous permettra de comprendre les mécanismes de modulation de la production des polyamines utilisés par Pa. Nous évaluerons l'effet de la production des polyamines sur la cytotoxicité de Pa grâce à des mutants PH KO (rendus faibles producteurs) ou PB complétés (surexpression des gènes de biosynthèse des polyamines). Enfin, nous évaluerons in vivo l'effet de la production de ces métabolites sur la virulence de Pa en modèle murin d'infection en utilisant les mutants ainsi que des inhibiteurs connus de la synthèse de la putrescine actifs chez Pa.

**Résultats**

L'analyse comparative des séquences et des taux de transcrits des gènes impliqués dans la synthèse et le catabolisme de la putrescine et de la spermidine, nous indiquera quels sont les mécanismes mis en jeu pour le contrôle de la production des polyamines chez les isolats de Pa. De précédentes études ayant montré que le déficit d'importation de la spermidine (via des mutants de transporteurs) entraînait une abolition de l'expression des régulateurs des principaux gènes du T3SS, les différents mutants dans les gènes de biosynthèses (speA, speC, speD, speE, AguAB) de la spermidine et de la putrescine (mutants KO et de surexpression) nous permettraient d'affirmer ou d'infirmer le lien de causalité entre la surproduction des polyamines par les isolats et l'augmentation de la cytotoxicité des souches de Pa ceci aussi bien in vitro qu'in vivo. Ainsi nous pensons pouvoir conclure sur l'importance de la modulation de la production des polyamines (constatée par notre analyse métabolomique) sur l'adaptation de Pa au cours des infections chroniques dans la mucoviscidose

**Discussion et conclusions**

La mise en évidence de voies métaboliques d'adaptation et la recherche des mécanismes sous-jacents est une stratégie innovante et efficace pour identifier des cibles au niveau des bactéries permettant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Celles-ci sont devenues indispensables dans le cas de Pa et de la mucoviscidose car cette bactérie a développé de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques classiques. C'est pourquoi nous allons tester un inhibiteur connu de la synthèse de la putrescine, actif chez Pa, in vitro et in vivo.

**Références**

Non communiquées

**FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Oui

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

AUTRE :

**VALDÉS Loréna****VARIATIONS DE METHYLATION DE L'ADN DANS DES GENES DE LA VOIE JAK/STAT CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE**

Loréna Valdés, Jorg Tost, Isabelle Rivals, Milena Magalhães, Florence Busato, Laurent Mely, Sylvie Leroy, Marlène Murriss, Mireille Claustres, Davide Caimmi, Isabelle Vachier, Raphaël Chiron et Albertina De Sario

1.PhyMedExp INSERM, Montpellier 2.CNRS, Montpellier 3.Université de Montpellier, Montpellier

**Objectifs**

L'objectif général de notre étude est de mieux comprendre la variabilité clinique qui caractérise les patients atteints de mucoviscidose, en combinant des analyses génomiques et épigénomiques. Cette approche permet d'identifier des facteurs de variabilité qui pourraient être non héréditaires, voire liés à l'environnement.

**Matériels et méthodes**

La cohorte MethylCF (51 patients atteints de mucoviscidose F508del/F508del et 24 témoins sains) a été réunie par quatre CRCM du Sud de la France (Montpellier, Hyères, Nice et Toulouse). La méthylation de l'ADN a été analysée par hybridation sur la puce MethylEpic (Illumina) sur des échantillons de sang de la cohorte MethylCF. Puis, en utilisant des modèles de régression linéaire, nous avons corrélé les données épigénomiques avec les données cliniques des patients, notamment la condition patient/témoin, la fonction pulmonaire (VMS, CVF) et l'IMC. Le logiciel WebGestalt a été utilisé pour étudier la fonction des gènes associés aux dinucléotides CpG différenciellement méthylés. Enfin, les données de méthylation de l'ADN ont été croisées avec des données transcriptomiques (RNA-seq) générées auparavant sur les mêmes échantillons de sang (Pineau et al., 2020). Les niveaux de méthylation de l'ADN de CpG d'intérêt ont été validés par pyroséquençage avec un PyroMark Q24 (Qiagen).

**Résultats**

Nous avons identifié de nombreux dinucléotides CpG dans lesquels le niveau de méthylation de l'ADN corrèle avec une ou plusieurs variables cliniques dans la cohorte MethylCF. Trois CpG différenciellement méthylés dans la mucoviscidose sont associés au gène SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3). Ce gène, très fortement exprimé dans le sang de patients atteints de mucoviscidose, code pour une protéine importante pour la régulation de l'inflammation. A noter également que 12 gènes différenciellement méthylés dans la mucoviscidose codent pour des protéines qui interagissent (directement ou indirectement) avec la protéine SOCS3 et jouent un rôle dans la voie de signalisation JAK/STAT. Enfin, les niveaux de méthylation de l'ADN de quatre gènes ont été validés par pyroséquençage.

**Discussion et conclusions**

L'analyse du méthylome d'échantillons de sang met en évidence le rôle joué par la voie de signalisation JAK/STAT dans la mucoviscidose. Des analyses fonctionnelles sont nécessaires pour mieux caractériser le rôle des gènes identifiés et le mécanisme de régulation de la transcription via des variations de méthylation dans des séquences cis-régulatrices.

**Références**

1.Magalhães M et al. DNA methylation at modifier genes of lung disease severity is altered in cystic fibrosis. Clin Epigenetics. 9:19. doi: 10.1186/s13148-016-0300-8. eCollection (2017). 2.Magalhães M et al. Dynamic changes of DNA methylation and lung disease in cystic fibrosis: lessons from a monogenic disease. Epigenomics. 10(8):1131-1145. doi: 10.2217/epi-2018-0005 (2018). 3.Scott M, De Sario A. DNA methylation changes in cystic fibrosis: Cause or consequence? Clin Genet. doi: 10.1111/cge.13731. (2020) Review. 4.Pineau F et al. Blood co-expression modules identify potential modifier genes of diabetes and lung function in cystic fibrosis. PLoS One.15(4):e0231285. doi: 10.1371/journal.pone.0231285. eCollection (2020).

**FINANCEMENTS**

VAINCRE LA MUCOVISCIDOSE : Oui

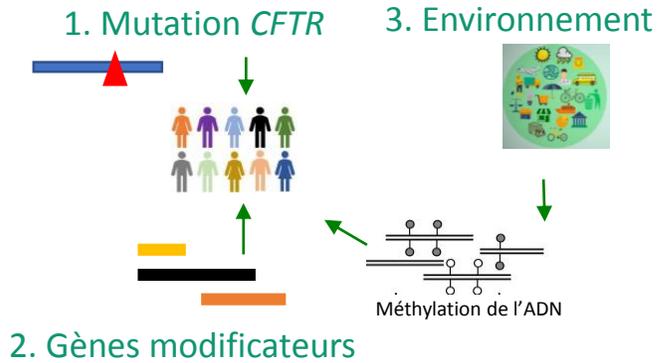
ASSOCIATION GREGORY LEMARCHAL : Non

BLANCHE POUR VAINCRE : NON

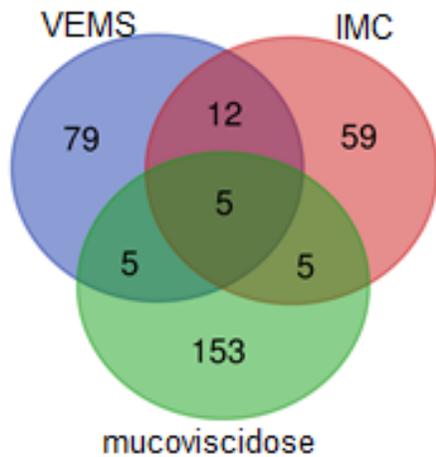
AUTRE : Fondation Maladies Rares, CHU de Montpellier et CNPq (Brésil)

# Variations de méthylation de l'ADN dans les gènes de la voie JAK /STAT chez les patients atteints de mucoviscidose

## Trois facteurs déterminent la variabilité clinique de la mucoviscidose



→ La méthylation de l'ADN de nombreux CpG corrèle avec le VEMS, l'IMC et la mucoviscidose.



→ Les gènes *SOCS3*, *SBNO2*, *FADD* et *CLECL1*, impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire, ont été validés par pyroséquençage.

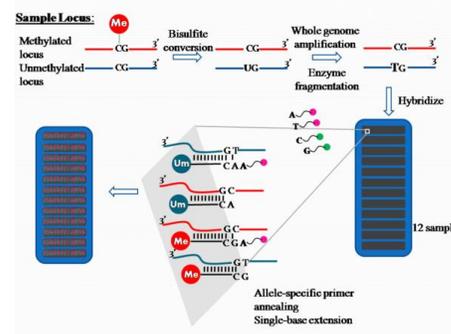
Cohorte MethylCF

F508del/F508del

51 patients CF

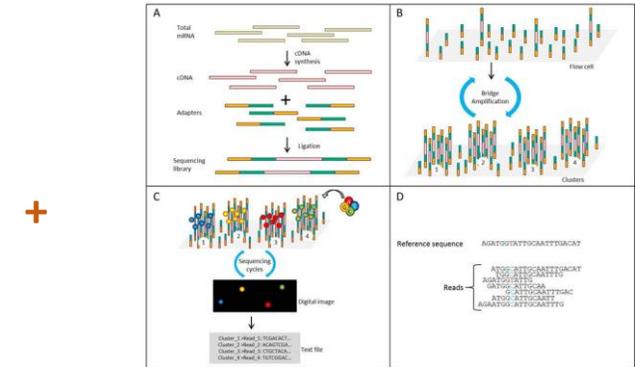
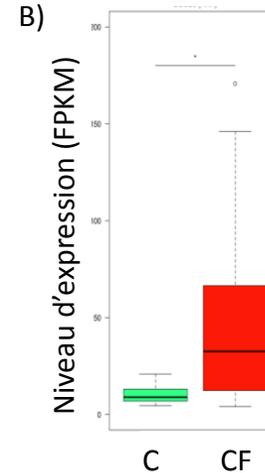
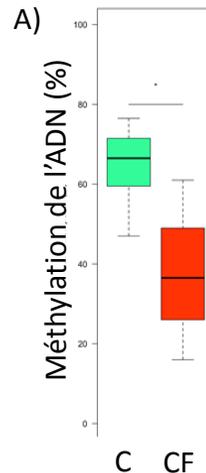


24 témoins



Analyse *genome-wide* de la méthylation de l'ADN avec la puce 850K *MethyEpic Beadchip*. Validation par **pyroséquençage Pyromark**.

→ *SOCS3* est moins méthylé (A) et beaucoup plus exprimé (B) chez les patients CF que chez les témoins. Il corrèle aussi avec le VEMS, l'IMC et le diabète.



Le **transcriptome** a été généré par **RNA-seq** (Pineau *et al.*, 2020).

→ La protéine *SOCS3* est impliquée dans la régulation de l'inflammation via la voie de signalisation JAK/STAT. Elle a pour fonction d'inhiber la transmission du signal des cytokines.

